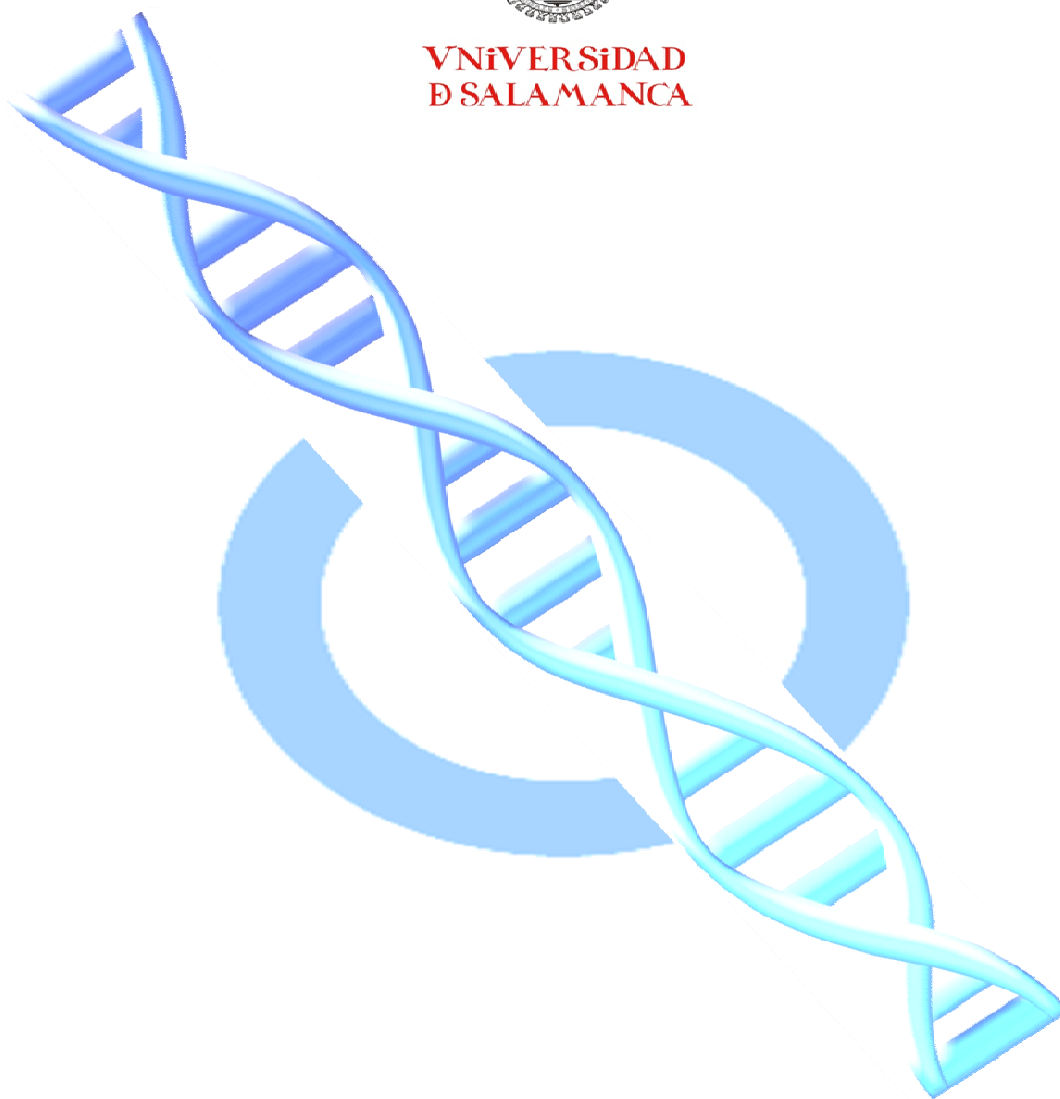




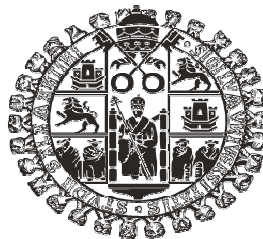
VNIVERSIDAD
D SALAMANCA



ESTUDIO GENÉTICO DE DIABETES EN LA POBLACIÓN DE CASTILLA Y LEÓN

TESIS DOCTORAL

Elena González Ruano



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

ESTUDIO GENÉTICO DE
DIABETES EN LA POBLACIÓN
DE CASTILLA Y LEÓN

Unidad de Medicina Molecular

Departamento de Medicina

Elena González Ruano

Directores: Rogelio González Sarmiento y José Manuel Miralles García

D. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y D. JOSE MANUEL MIRALLES GARCÍA, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “Estudio genético en diabetes en la población de Castilla y León”, que presenta el Licenciado en Bioquímica Dña. Elena González Ruano, ha sido realizado bajo nuestra dirección en la unidad de Medicina Molecular del Departamento de Medicina y, reúne, a nuestro juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presenado ante el tribunal correspondiente y optar al título de “Doctor en Bioquímica” por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expide el presente certificado en Salamanca a 7 de Mayo de 2010

Fdo. D.Rogelio González Sarmiento

Fdo. D. José Manuel Miralles García

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, mi agradecimiento es para el profesor D. Rogelio González Sarmiento por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo, por sus consejos y por descubrir el mundo de la investigación. También agradecer al profesor D. José Manuel Miralles García su implicación y ayuda en este trabajo, así como al servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario de Salamanca y los servicios de Endocrinología de los distintos hospitales de la comunidad de Castilla y León, sin los que este estudio no hubiera sido posible.

En segundo lugar agradecer a mis padres y mi hermana su apoyo constante en todas mis decisiones y el saber que puedo contar con ellos en todo momento.

A Carlos sobre todo por su paciencia y su entrega todos estos meses, estando tan cerca de mí a pesar de la distancia física entre nosotros, eres mi mejor regalo.

A mis compañeros de laboratorio Sara, Laura, Mercedes, Eva, Jose Luis, Dani, Laurita, Irene, Clara, Jessi, Catia, Mónica, Chus, Carlos, Bailey (Paco), Nieves y Encarna todos los momentos vividos en el laboratorio: las horas codo a codo en la poyata, los cafés, los batidos, la piscina... tantos y tantos momentos que no voy a olvidar y que me han hecho sentir que más que unos compañeros de trabajo, son amigos que van a estar ahí y que nunca voy a olvidar. También quiero tener un recuerdo con los compañeros que ya no están en el laboratorio pero que me aportaron, no solo sus conocimientos, sino también su amistad y su cariño. Muchas gracias a todos por ser como sois!

A Estrella por aportarme siempre con una sonrisa todas las informaciones burocráticas.

A mis amigas Mercedes, Tamara, Marian, Sara, Sara rizo, Mamen por ser precisamente eso, mis amigas, por estar siempre ahí y por poder contar con vosotras en todo momento, tanto en lo malo como en lo bueno.

A Esperanza, Esther, Raquel y Belinda, por vuestras broncas y por vuestros consejos y sobre todo, por ser como sois.

Por último mi agradecimiento más especial para todos los diabéticos y diabéticas que han colaborado en este estudio, esperando, con este trabajo, aportar un poco de luz sobre esta enfermedad

ABREVIATURAS

CTLA44: cytotoxic T lymphocyte associated 4

DM1: Diabetes mellitus tipo 1

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

EDN1: Endotelina 1

NOS3: óxido nítrico sintasa endotelial

GCK: glucoquinasa

GWA: genomic wide association

HLA: human leukocyte antigen

HNF1A: Hepatic nuclear factor 1 A

HNF4A: Hepatic nuclear factor 4 A

IFN γ : interferon gamma

IL-1 β : Interleucina 1beta

IL-4: Interleucina 4

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

MODY: maturity onset diabetes of the young

NOD: non obese diabetic

OR: odd ratio

PPAR γ : Peroxisoma proliferator activated receptor gamma

TCF7L2: Transcription factor 7 like-2

TNF α : tumor necrosis factor alfa

VEGF: vascular endothelial growth factor

VNTR: variable number tandem repeat

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. METABOLISMO DE LA GLUCOSA	1
1.1 Transportadores de la glucosa	3
1.2 La Insulina	5
1.2.1 Acciones de la insulina	6
2. DIABETES MELLITUS	8
2.1 Criterios de diagnóstico de la OMS	9
2.2 Diabetes Mellitus tipo 1	9
2.2.1 Fisiopatología de la DM 1	10
2.2.2 Factores genéticos	12
2.2.3 Factores ambientales	13
2.2.4 Complicaciones de la DM1	14
a) <u>Cetoacidosis</u>	14
b) <u>Retinopatía diabética</u>	15
d) <u>Nefropatía diabética</u>	15
e) <u>Angiopatías y neuropatías</u>	15
2.3 Diabetes Mellitus tipo 2	16
2.3.1 Fisiopatología de la DM2	17
2.3.2 Factores genéticos	18
2.3.3 Factores ambientales	20
2.3.4 Complicaciones de la DM2	20
2.4 Genes diana relacionados con susceptibilidad a DM1 y DM2	22
2.4.1 Citoquinas proinflamatorias	22
a) <u>Gen IL1B</u>	22
b) <u>Gen IL6</u>	23
c) <u>Gen TNFA</u>	24
d) <u>Gen CD40</u>	25
2.4.2 Citoquinas antiinflamatorias	26
a) <u>Gen IL4</u>	26
b) <u>Gen IL4R</u>	27
2.4.3 Gen IL8	28
2.4.4 Gen CTLA4	28
2.4.5 Gen PPARG	29
2.4.6 Gen TCF7L2	30
2.4.7 Genes relacionados con el funcionamiento del endotelio vascular	31
a) <u>Gen EDN1</u>	31

b) <u>Gen VEGF</u>	32
c) <u>Gen NOS3</u>	32
2.5 Diabetes MODY	33
2.5.1 Diabetes MODY 1	35
a) <u>Características del gen HNF4 A</u>	35
b) <u>Características de la proteína HNF4α</u>	37
c) <u>Funciones de HNF4α</u>	38
d) <u>HNF4A y su implicación en diabetes MODY</u>	39
2.5.2 Diabetes MODY 2	40
a) <u>Características del gen GCK</u>	41
b) <u>Características de la proteína GCK</u>	41
c) <u>Regulación de GCK</u>	44
d) <u>Papel de la GCK en el metabolismo de la glucosa</u>	45
e) <u>GCK y su implicación en la diabetes MODY</u>	46
2.5.3 Diabetes MODY3	47
a) <u>Características del gen HNF1A</u>	48
b) <u>Características de la proteína HNF1α</u>	49
c) <u>Funciones de HNF1α</u>	50
d) <u>HNF1A y su implicación en diabetes MODY</u>	52
2.5.4 Diabetes MODY 4	54
a) <u>Características del gen PDX-1</u>	54
b) <u>Características de la proteína IPF-1</u>	55
c) <u>Funciones de IPF-1</u>	55
d) <u>IPF-1 y su implicación en la diabetes MODY</u>	55
2.5.5 Diabetes MODY 5	56
a) <u>Características del gen HNF1B</u>	56
b) <u>Características de la proteína HNF1β</u>	56
c) <u>Funciones de HNF1β</u>	57
d) <u>HNF1B y su implicación en diabetes MODY</u>	57
2.5.6 Diabetes MODY 6	58
a) <u>Características del gen NEUROD1</u>	58
b) <u>Características de la proteína NEUROD1/BETA2</u>	58
c) <u>Funciones de NEUROD1/BETA2</u>	59
d) <u>NEUROD1 y su implicación en diabetes MODY</u>	59
OBJETIVOS	61
MATERIALES Y METODOS	62
1. PACIENTES	69

1.1 Pacientes incluidos en el estudio de caracterización de variantes alélicas asociadas al desarrollo de diabetes	62
1.2 Pacientes incluidos en el estudio genético de diabetes MODY	62
2. EXTRACCIÓN DE DNA	62
3. DISCRIMINACIÓN ALÉLICA MEDIANTE PCR CON SONDAS TAQMAN	64
4. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA DIABETES MODY MEDIANTE EL ESTUDIO DE LOS GENES GCK, HNF1A Y HNF4A	67
4.1 PCR	67
4.2 Análisis de los productos amplificados por PCR mediante CSGE	70
4.3 Secuenciación automática	71
5. CARACTERIZACIÓN DE LA MUTACIÓN p.K205N DEL GEN HNF1A	73
5.1 Extracción de RNA y síntesis de cDNA del gen HNF1A	73
5.2 Amplificación del promotor del gen GLUT2 mediante PCR	76
5.3 Clonación en vectores de expresión	77
5.3.1 Clonación en el vector pGEM-T®Easy	77
5.3.2 Preparación de células competentes	77
5.3.3 Transformación de las células competentes	78
5.3.4 Extracción de DNA plasmídico de colonias transformadas	78
5.3.5 Clonación en el vector de expresión pCEFL	79
5.3.6 Clonación en el vector de expresión pGL3-Basic	80
5.4 Mutagénesis dirigida	81
5.4.1 PCR	82
5.4.2 Digestión con DpnI	83
5.4.3 Transformación en las células supercompetentes XL-Blue	83
5.5 Transfección transitoria de las células COS-1 y HEPG2	84
5.6 Ensayo de luciferasa	85
6. PROGRAMAS BIOINFORMÁTICOS	86
6.1 Programas estadísticos	86
6.2 Análisis de secuencias	87
6.3 Programas de predicción patogenicidad de mutaciones	87
6.3.1 POLYPHEN	88
6.3.2 PMUT	89
6.3.3 SIFT	89
6.4 Programa de predicción de la estructura tridimensional de proteínas	90
RESULTADOS	91

1. CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS ASOCIADAS A SUSCEPTIBILIDAD AL DESARROLLO DE DIABETES	91
1.1 Estudio de genes de citoquinas proinflamatorias	91
1.1.1 Estudio del polimorfismo -511 C>T del gen IL1B	91
1.1.2 Estudio del polimorfismo -174 G>G del gen IL6	92
1.1.3 Estudio del polimorfismo -238 A>G del gen TNFA	93
1.1.4 Estudio del polimorfismo -1 C>T del gen CD40	94
1.1.5 Estudio de haplotipos	95
1.2 Estudio de genes de citoquinas antiinflamatorias	96
1.2.1 Estudio del polimorfismo -33 C>T del gen IL4	96
1.2.2. Estudio del polimorfismo 223 A>G del gen IL4R	97
1.2.3 Estudio de haplotipos	99
1.3 Estudio del polimorfismo -251 A>T del gen IL8	99
1.3.1 Estudio de haplotipos	100
1.3.2 Estudio de haplotipos	101
1.4 Estudio del polimorfismo 34 C>G del gen PPARG	102
1.5. Estudio del polimorfismo IVS3 C>T del gen TCF7L2	103
1.6 Estudio de haplotipos	104
1.7 Estudio de genes relacionados con el funcionamiento del endotelio vascular	105
1.7.1 Estudio del polimorfismo 594 G>T del gen EDN1	105
1.7.2 Estudio del polimorfismo -2578 A>C del gen VEGF	106
1.7.3 Estudio del polimorfismo 894 G>T del gen NOS3	107
1.7.4 Estudio de haplotipos	108
1.8 Estudio del polimorfismo 49 A>G del gen CTLA4	108
1.9 Estudio del polimorfismo 293 C>T del gen HNF1A	109
2. ESTUDIO GENÉTICO DE DIABETES MODY	111
2.1 Estudio del gen HNF1A	111
2.1.1 Caracterización de nuevas isoformas del gen HNF1A	115
2.1.2 Ensayo de la actividad luciferasa	117
2.2 Estudio del gen GCK	119
2.3 Estudio del gen HNF4A	124
2.4 Resumen de resultados del estudio de los genes HNF1A, GCK y HNF4A	126
DISCUSION	127
1. CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES ALÉLICAS DE SUSCEPTIBILIDAD AL DESARROLLO DE DIABETES	127

1.1 Estudio de las variantes alélicas de las citoquinas proinflamatorias	127
1.2 Estudio de las variantes alélicas de las citoquinas antiinflamatorias	132
1.3 Estudio del polimorfismo -251 A>T del gen IL8	135
1.4 Estudio de las variantes alélicas 34 C>G del gen PPARG e IVS3 del gen TCF7L2	137
1.5 Estudio de las variantes alélicas de genes relacionados con el funcionamiento del endotelio vascular	139
1.6 Estudio del polimorfismo 49 A>G del gen CTLA4	141
1.7 Estudio del polimorfismo 293 C>T del gen HNF1A	142
1.8 Conclusiones generales del estudio de variantes genéticas relacionadas con la susceptibilidad al desarrollo de diabetes	143
2. ESTUDIO GENÉTICO DE DIABETES MODY	144
CONCLUSIONES	150
BIBLIOGRAFIA	152
ANEXO	176

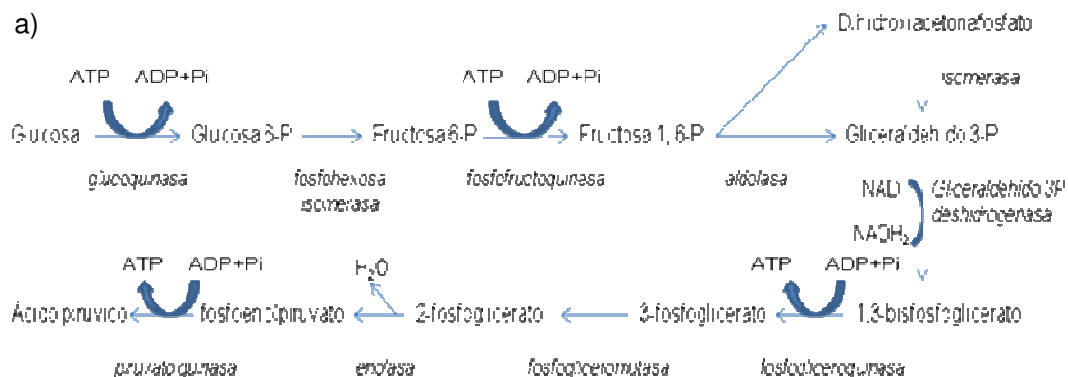
1. INTRODUCCIÓN

1. METABOLISMO DE LA GLUCOSA

El metabolismo se define como el conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en el organismo, implicadas en la producción y consumo de energía, la síntesis de nuevos componentes, así como en la eliminación de los productos de desecho. El sistema endocrino es uno de los encargados de la regulación de todos estos procesos y, por lo tanto, del mantenimiento de la homeostasis (Berne, 2001).

Los hidratos de carbono son la principal fuente de energía, además de formar parte de numerosas estructuras a través de la formación de glucolípidos y glucoproteínas. Dentro de los hidratos de carbono, la glucosa es el azúcar más utilizado por las células para la obtención de energía, y algunos tejidos, como el sistema nervioso o los eritrocitos, solo utilizan la glucosa como fuente de energía (Berne, 2001).

Cuando la glucosa entra en las células es fosforilada a glucosa 6-fosfato, comenzando así la primera etapa de la glucólisis y la glucogenogénesis, que consisten en una serie de reacciones químicas en las que bien la glucosa es catabolizada hasta piruvato y en la cual se obtienen dos moléculas de ATP (adenosin trifosfato), que es el donador de energía libre más importante utilizado por las células, o bien se dirige hacia la síntesis de glucógeno (Figura 1). Cada una de estas reacciones están catalizadas por una enzima específica y tienen lugar en el citosol y en las mitocondrias (Boiteux and Hess, 1981).



b)

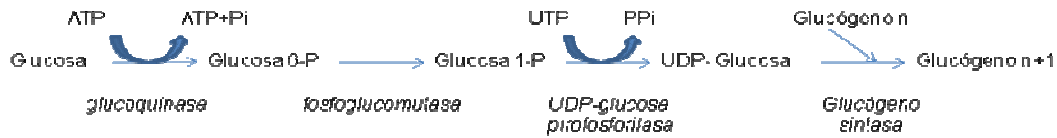


Figura 1. a) Reacciones que componen la glucólisis. b) Reacciones que forman parte de la síntesis de glucógeno.

El piruvato generado en la glucólisis puede ser transformado en acetil CoA por medio de la piruvato deshidrogenasa y entrar en el ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs, donde sufre una serie de transformaciones en las cuales se libera CO_2 y los transportadores de electrones FADH y NADH , que, a su vez, mediante la cadena respiratoria presente en la membrana interna de la mitocondria, liberan los electrones hasta moléculas de O_2 para formar H_2O . (Figura 2). El flujo de electrones sirve para generar más moléculas de ATP. Junto con los ATPs producidos durante la glucólisis, a partir de una molécula de glucosa pueden producirse hasta 30 moléculas de ATP, lo cual se traduce en una eficiencia energética del 66% (Strayer, 1995).

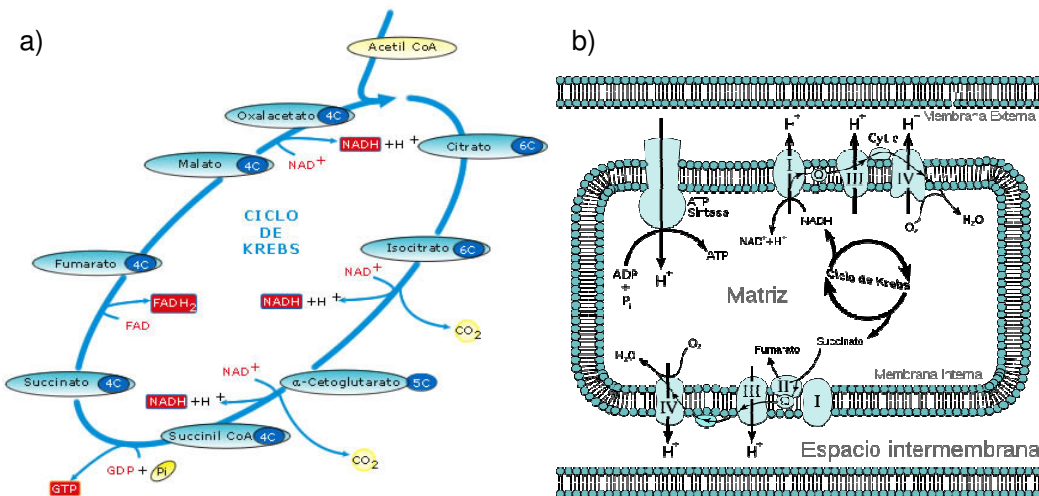


Figura 2. a) Representación esquemática del ciclo de Krebs. Cada una de las reacciones está catalizada por una enzima específica. b) Esquema de la cadena transportadora de electrones, en la cual en el FADH y NADH formados durante el ciclo de Krebs y la glucólisis, son oxidados hasta H_2O y generando ATP.

La mayor parte de la glucosa ingerida, sin embargo, es almacenada en forma de glucógeno en el hígado y en el músculo. El glucógeno es un polímero ramificado de glucosa fácilmente movilizable. La síntesis y degradación del glucagón está controlada coordinadamente a través de hormonas como la insulina y el glucagón (Fell, 1992).

La concentración media de glucosa plasmática en ayunas es de 80 mg/dl (4,5 mM) y varía entre 60 mg/dl y 110 mg /dl. En condiciones basales el metabolismo de la glucosa en adultos es de unos 225 g/día, en la cual hasta el 55% de su uso acaba en su degradación oxidativa hasta CO₂, principalmente por el sistema nervioso.

1.1 TRANSPORTADORES DE GLUCOSA

La glucosa ingerida a través de los alimentos, o procedentes de la gluconeogénesis, entra en las células a través de los transportadores de glucosa (GLUT). Existen otro tipo de transportadores de glucosa (SGLT) que se localizan en células de intestino delgado y riñón y transportan conjuntamente glucosa y sodio (Wood y Trayhurn, 2003).

Los GLUT son glicoproteínas de 45 a 55 KDa con doce dominios transmembrana en estructura de α -hélice (Figura 3), que presentan un sitio de glucosilación en la región externa de la membrana. Las α -hélices 3,5, 7 y 11 forman un poro en la membrana que permite el paso del monosacárido a favor de gradiente, para lo que es necesario la formación de puentes de hidrógeno entre la glucosa y los extremos de los aminoácidos de las α -hélices (Hajdúch et al., 1995). La glucosa entra en la célula en cuatro etapas: en la primera se une a la cara externa del transportador; posteriormente, el transportador cambia su conformación de manera que la glucosa y su sitio de unión quedan localizados en la cara interna de la membrana donde la glucosa es liberada al citoplasma y por último, el transportador cambia de nuevo su conformación al estado inicial (Gaster et al., 2000).

Existen 4 tipos principales de transportadores GLUT: GLUT1, que se expresa en eritrocitos, astrocitos, células endoteliales, retina y barrera hematoencefálica y placentaria. GLUT2, localizado en las células β pancreáticas, hígado, intestino y riñón. En el páncreas y en hígado GLUT2 actúa como sensor de glucosa en sangre debido a que facilita el transporte de glucosa cuando la glucemia es elevada; además, constituye un estímulo para la secreción de insulina por las células β y para la glucogenogénesis en el hígado. GLUT3, que se encuentra principalmente en sistema nervioso central y junto con GLUT1 facilitan el transporte vectorial de la glucosa desde la sangre hasta las neuronas. GLUT4 se localiza principalmente en músculo y tejido adiposo, y es activado por acción de la insulina, de forma que cuando ésta se une a su receptor en las células musculares y adipocitos, da lugar a un cambio conformacional en el mismo que estimula su actividad tirosín-quinasa, provocando el traslado de las vesículas que contienen GLUT4 a la membrana plasmática y, por tanto, la entrada de glucosa en la célula (Chen et al., 1999). Además de la insulina, el ejercicio también aumenta la proporción de GLUT4 en el músculo debido al proceso de contracción muscular y a la liberación de ciertos factores como la bradiquinina, aunque todavía no se conoce bien el mecanismo por el cual esto tiene lugar (Kubota et al., 2008).

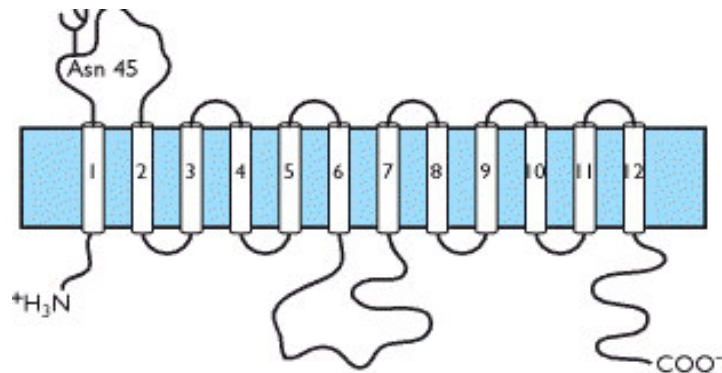


Figura 3. Modelo de transportador de glucosa en mamíferos, con los 12 dominios transmembrana. Los diferentes transportadores de glucosa presentan diferente localización celular y función, pero su estructura es muy similar en todos ellos.

1.2 LA INSULINA

La insulina es una hormona polipeptídica de 6 Kda que pertenece a la superfamilia de los factores de crecimiento, formada por dos cadenas lineales unidas por puentes disulfuro: las subunidades A y B, siendo esta última donde se encuentra el centro activo de la hormona (Figura 4). La insulina se sintetiza en las células β del páncreas que, junto con las células α , secretoras de glucagón, las células δ , secretoras de somatostatina, y las células secretoras del polipéptido pancreático, constituyen los islotes pancreáticos o islotes de la Langerhans (McEvoy y Hegre, 1977).

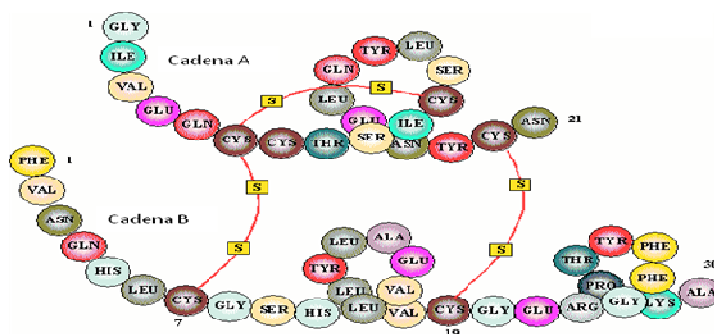


Figura 4. Representación de la insulina. Las cadenas A y B se encuentran unidas por puentes disulfuro.

El gen de la insulina, localizado en el cromosoma 11p15.5, se traduce en forma de preproinsulina. La preproinsulina se fragmenta dando lugar a la proinsulina que consta de una única cadena. La formación de puentes disulfuro entre las cadenas A y B va seguido por la escisión de un péptido de conexión entre ambas llamado péptido C. La insulina y el péptido C son almacenados en gránulos secretores del aparato de Golgi, que contiene Zinc y que permite la unión de seis moléculas de insulina para formar hexámeros. La insulina y el péptido C son liberados por exocitosis en cantidades equimolares hacia el torrente sanguíneo cuando se producen los estímulos necesarios en la célula β . La medida del péptido C, sin función conocida hasta el momento, sirve como marcador de la producción de insulina, ya que el péptido C no es degradado por el hígado como la insulina, y sus valores son equivalentes a los valores de insulina secretados por el páncreas (Hernandez et al., 1989; Horwitz et al., 1975).

1.2.1 ACCIONES DE LA INSULINA

Tras la digestión de los alimentos, la concentración de glucosa en plasma se eleva discretamente hasta 120-130 mg/dL. El transportador GLUT2, que es específico del hígado y de las células β pancreáticas, permite la difusión de la glucosa al interior de la célula, hasta que la concentración intracelular y extracelular se iguala. Entonces, la glucosa es fosforilada a glucosa-6 fosfato por la enzima glucoquinasa, continuando de esta manera la ruta glucolítica. Como consecuencia de esto, aumentan la concentración de ATP, NADH y NADPH, lo que provoca el cierre de los canales de K^+ sensibles a ATP. Se produce así una despolarización de la membrana que permite la apertura de canales de Ca^{2+} regulados por voltaje y el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, permite la exocitosis de los gránulos de insulina (Figura 5) (Dyachok et al., 2004).

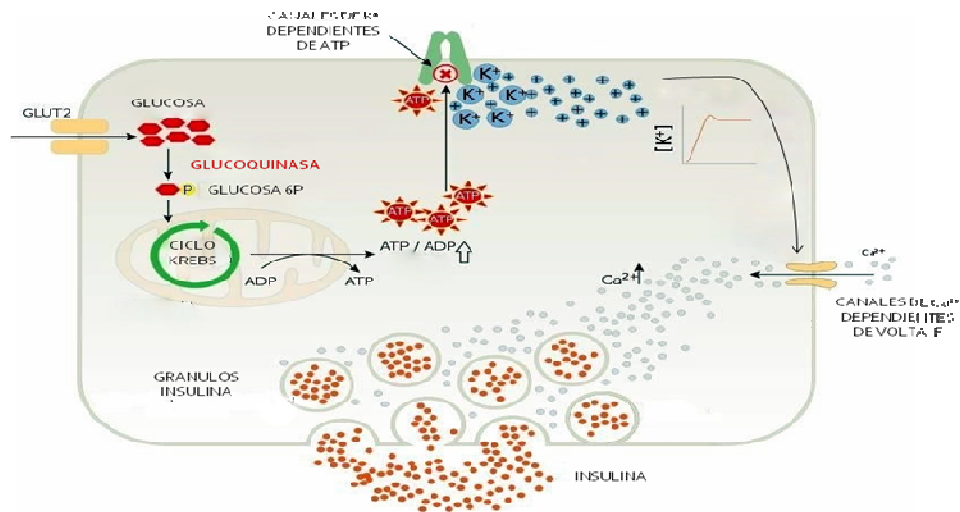


Figura 5. Esquema del mecanismo de liberación de insulina tras la ingestión de alimentos.

Los principales tejidos diana de la insulina son el hígado, músculo y tejido adiposo y en cada uno de ellos regula de forma coordinada el metabolismo glucídico, lipídico y proteico. La insulina se une a su receptor, una glucoproteína con actividad tirosín-quinasa, en la membrana plasmática. Este receptor presenta dos unidades y cada unidad está formada a su vez por dos subunidades, una subunidad α , que se encuentra hacia el exterior y que se une

directamente a la insulina, y una subunidad β , que atraviesa la membrana plasmática y se extiende hacia el citoplasma y es la que presenta la actividad tirosín-quinasa (Figura 6) (Brillon et al., 1988).

Cuando la insulina se une a su receptor se produce un cambio conformacional en el mismo y, como consecuencia de ello, tiene lugar la autofosforilación en residuos específicos de tirosina, induciendo la fosforilación de unas proteínas llamadas IRS (*insulin receptor substrate*), que inician una casacada de fosforilaciones en numerosas proteínas como la fosfatidiinositol 3 quinasa (PI3K) y la proteína de unión al receptor de crecimiento 2, lo que provoca el aumento de segundos mensajeros como AMP_c o el diacilglicerol, que desencadenan una cascada de fosforilaciones que, por un lado, permiten la traslocación del transportador GLUT4 a la membrana plasmática y, por otro, activan o inhiben diferentes rutas metabólicas así como la transcripción de genes relacionados con el crecimiento celular (Leibiger et al., 2001).

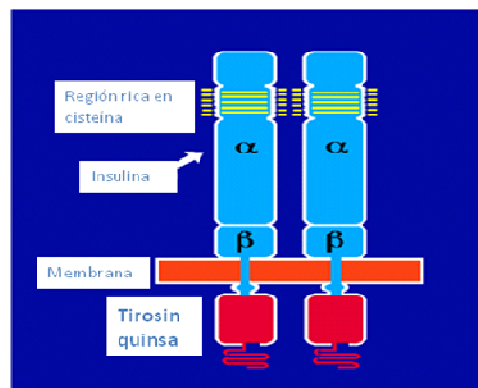


Figura 6. Esquema del receptor de la insulina. Este receptor presenta dos unidades, cada una de ellas dividida a su vez en dos subunidades, α y β . En el dominio intracelular se encuentra la actividad tirosín-quinasa.

La insulina es una hormona anabólica entre cuyas acciones se encuentra favorecer la captación de glucosa por la célula y la formación de glucógeno, así como la inhibición de la gluconeogénesis en el hígado y la degradación de glucógeno. Además, también favorece el almacenamiento de los ácidos grasos en el tejido adiposo, inhibe la lipólisis, aumenta la síntesis de proteínas y promueve la captación de K^+ al interior de la célula.

2. DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus se define como un síndrome crónico en el cual se ve afectado el metabolismo de glúcidos, lípidos y proteínas, y cuya principal consecuencia es el aumento de la concentración de glucosa en sangre (hiperglucemia). Se considera que hay diabetes cuando la concentración de glucosa plasmática en ayunas supera los 126 mg/dL o los 200 mg/dL en cualquier momento del día. La hiperglucemia se produce porque existe una deficiencia intensa o total de insulina, como en el caso de la diabetes mellitus tipo 1, o bien porque la insulina presente en el organismo no ejerce correctamente su función, como en el caso de la diabetes mellitus tipo 2 (Harrison, 2002). Existen otras formas de diabetes más raras causadas bien por defectos genéticos, bien inducidas por medicamentos, o bien debidas a enfermedades pancreáticas.

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es consecuencia de una destrucción de las células β del páncreas de manera que no hay secreción de insulina. La falta de insulina impide, entre otros efectos, la activación del transportador GLUT4, por lo que la glucosa no puede entrar en los tejidos y se acumula en la sangre provocando la hiperglucemia. Además, se produce un aumento de la lipólisis en tejido adiposo, la activación de la gluconeogénesis hepática y la formación de cuerpos cetónicos que puede ocasionar cetosis. Se caracteriza por la presencia de fenómenos autoinmunes y ausencia de obesidad (Atkinson y Eisenbarth, 2001).

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad muy heterogénea cuyas características principales son la resistencia a la insulina y una producción insuficiente de la misma. Se discute dónde reside la resistencia, pero parece ser que es a nivel de su unión al receptor. No hay tendencia a cetosis y suele estar asociada a obesidad aunque no en todos los casos (Harrison, 2002).

2.1 CRITERIOS DE DIAGNOSTICO DE LA OMS

Los criterios de diagnóstico de la diabetes mellitus han sido elaborados por un comité de expertos internacionales en colaboración con la *American Diabetes Association* (ADA). En la clasificación actual de la diabetes se han eliminado los términos insulino dependiente e insulino independiente, ya que muchos pacientes con DM2 acaban necesitando insulina para el control de la glucemia (Malecki y Skupien, 2008).

Se conservan los términos diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2, con número arábigos en lugar de número romanos debido a que el número II puede equivocarse con 11. La clasificación actual establece cuatro tipos de diabetes: diabetes tipo 1, que a su vez se divide en tipo A, producida por destrucción autoinmune de las células β del páncreas, y tipo 1 B o idiopática en la cual se desconocen los motivos de la destrucción de estas células; diabetes tipo 2; diabetes gestacional y otros tipos de diabetes mellitus en los cuales se incluye la diabetes MODY, diabetes causadas por enfermedades del páncreas, defectos genéticos en la secreción de insulina, endocrinopatías, inducidas por fármacos y las provocadas por infecciones (Davidson, 2010).

Los criterios de diagnóstico de la diabetes mellitus son los siguientes: síntomas típicos (polidipsia, poliuria y polifagia) y una glucemia en plasma venoso igual o superior a 200 mg/dL (11.1mM) en cualquier momento del día, glucemia basal en ayunas en plasma venoso igual o superior a 126 mg/dL (7mM), glucemia en plasma venoso igual o superior a 200 mg/dL (11.1mM) a las 2 horas de la sobrecarga con 75 g de glucosa y una hemoglobina glicosilada (Hb1%c) igual o superior a 6,5% por el método certificado NGSP, si bien esta última determinación aún no está definitivamente asumida como marcador diagnóstico (Davidson, 2010).

2.2. DIABETES MELLITUS TIPO 1

La diabetes tipo 1 (DM1) es una de las enfermedades crónicas más frecuentes en la infancia y adolescencia. Representa entre un 10-15% de todas

las formas de diabetes en el mundo. Su prevalencia en España es de 1/4000 y su incidencia de 11 nuevos casos por cada 100000 habitantes/año. Sin embargo, esta tendencia está incrementándose y se estima que en el año 2020 aumente hasta un 70% el número de casos en Europa. El pico de edad de aparición de la diabetes está disminuyendo desde los 12-14 años hasta edades más tempranas (Patterson et al., 2009). Los factores ambientales, como el aumento de peso y altura, el número de nacimientos por cesárea y la reducción de la frecuencia de las infecciones a edad temprana, pueden ser claves para explicar este aumento de tendencia, más que los factores genéticos (Patterson et al., 2009).

2.2.1 FISIOPATOLOGIA DE LA DM1

La DM1 es una enfermedad autoinmune mediada principalmente por linfocitos T (Wang et al., 1991). La primera etapa de la enfermedad consiste en la invasión linfocitaria del páncreas, macrófagos y células dendríticas (DCs) en un proceso denominado insulitis (Lernmark et al., 1995). Las primeras células en infiltrarse en los islotes pancreáticos son los macrófagos ED1+ y las células dendríticas, que liberan una serie de citocinas que activan los linfocitos T CD8 y CD4, desencadenando una respuesta inflamatoria que tiene como consecuencia la destrucción de las células productoras de insulina. Los autoantígenos que reconocen y activan a los linfocitos T son diversos e incluye a la insulina, la glutamato descarboxilasa (GAD), la proteína asociada a insulinooma (IA-2) y la proteína HSP60 (Lernmark et al., 1995). El mecanismo de destrucción de las células β se produce a través de apoptosis, aunque el factor desencadenante del mismo así como la ruta de señalización predominante no se conoce con exactitud.

Algunas citocinas como IL1 β , TNF α , IFN γ , NF κ β , perforina, el ligando Fas (CD25) y los niveles de Ca²⁺ intervienen en la apoptosis de las células β , bien a través de cascadas de fosforilaciones que activan la ruta JAK/STAT, bien a través de señales apoptóticas procedentes de las mitocondrias, como Bcl2, o bien mediante señales de estrés celular (Figura 7) (Cnop et al., 2005). Así, se piensa que los linfocitos T CD4 actuarían a través de la señalización

TNF α , mientras que los linfocitos T CD8 lo harían a través del sistema perforina-granzima B, aunque sigue habiendo controversia sobre cuál de estas rutas serían la primera en actuar en la destrucción de las células β (Lee et al., 2004a).

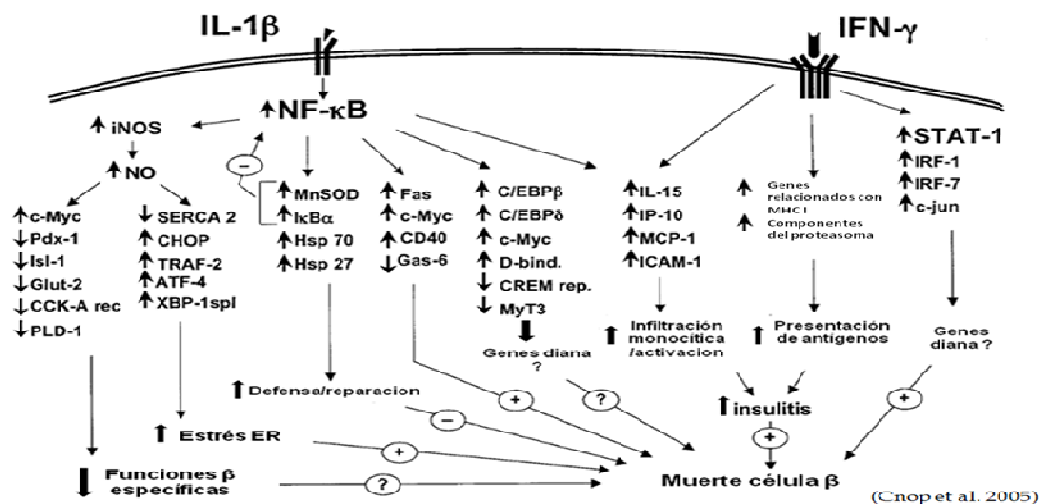


Figura 7. Representación de las rutas de señalización que pueden estar implicadas en la muerte de las células β . Los factores STAT1 y NF- κ B son los principales efectores de las rutas activadas por IFN- γ e IL-1 β respectivamente (Cnop et al., 2005).

Otro mecanismo que puede intervenir en la fisiopatología de la DM1 es a través de los linfocitos T CD4 reguladores (Tregs) que se encargan de la regulación de la tolerancia periférica. Los linfocitos Treg constituyen una población policlonal con un repertorio diverso de TCRs que permite el reconocimiento de los autoantígenos y, a su vez, controlar los linfocitos T autorreactivos (Hsieh et al., 2006). Estos linfocitos se inactivan a través de la supresión de la producción de IL-2 en las células efectoras (Sgouroudis y Piccirillo, 2009) y su actividad es dependiente de IL-10, TGF- β , IL-35 y CTLA-4. Según estudios realizados en ratones NOD (non-obese diabetic), la actividad de las células Treg parece estar disminuida, lo que facilitaría la actividad de las células T autorreactivas en el páncreas. En humanos los datos sobre el número y actividad de los linfocitos Treg son más contradictorios, debido probablemente a un mal aislamiento de estas células, aunque parece evidente su papel en el inicio y desarrollo de la enfermedad (Sgouroudis y Piccirillo, 2009).

2.2.2 FACTORES GENETICOS

Hasta el momento se han descrito 20 loci implicados en la susceptibilidad a padecer DM1, aunque los loci que contienen los genes HLA, insulina, CTLA4 y PTPN22 son los que presentan mayor asociación con DM1 en población caucásica (Howson et al., 2009; Ikegami et al., 2007).

El primer locus en describirse, hace más de 20 años, es la región HLA (Human Leukocyte Antigen) del cromosoma 6p21 que comprende 3,5 Mb y codifica proteínas que intervienen en el procesamiento de antígenos al interior de la célula y su posterior transporte a la membrana para que sean reconocidas por los linfocitos T y desencadenar de esta forma una respuesta inmune. Los genes relacionados con susceptibilidad a DM1 son los HLA clase II DR y DQ, que son genes muy polimorfos y la diferente combinación de alelos genera haplotipos que pueden conferir tanto susceptibilidad como protección frente a DM1. Así los haplotipos HLA-DQA*0301-DQB1*0302(DQ8), HLA-DRB1*0401, *0402 o *0405 y HLA-DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201(DQ2), confieren un alto grado de susceptibilidad a padecer DM1 ya que hasta un 90% de los pacientes presentan alguno de estos haplotipos, mientras que los haplotipos HLA-DQA1*102-DQB1*0602-DRB1*1501 confiere protección frente a la misma (Redondo y Eisenbarth, 2002). La influencia de las moléculas HLA sobre la diabetes puede estar relacionada con su capacidad para presentar péptidos a los linfocitos T y la activación de los mismos (Latek et al., 2000).

El locus IDDM2 se encuentra en la región cromosómica 11p15 e incluye el gen de la insulina. En la región 5' no codificante de este gen existe un número variable de repeticiones en tándem o VNTRs. Existen tres clases de VNTRs dependiendo del número de repeticiones, la clase I que incluye de 26 a 63 repeticiones, la clase II de aproximadamente 80 repeticiones y la clase III que comprende entre 140-200 repeticiones. Estas variaciones están correlacionadas con la expresión diferencial de la insulina en el páncreas y en el timo, así como con la expresión placentaria de IGF-2 que se encuentra aguas abajo del gen de la insulina. Los individuos homocigotos para los alelos de clase II presentan alto riesgo de padecer diabetes, mientras que los

homocigotos para la clase III parecen estar protegidos frente a la misma, ya que estos alelos conducen a una mayor expresión de insulina en el timo, lo que permite la selección negativa de los linfocitos T autorreactivos (Pugliese et al. 1997) .

Otro locus relacionado con la aparición de DM1 se localiza en el cromosoma 2q33 donde se encuentra el gen CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen)(IDDM8), que se expresa en células T activadas, se une a moléculas B7 y limita la respuesta proliferativa de los linfocitos T. Se ha observado que el polimorfismo p. T17A está asociado a susceptibilidad a DM1, de manera que los portadores de alanina tienen más riesgo de presentar DM1 y otras enfermedades autoinmunes (Redondo y Eisenbarth, 2002).

Finalmente, el locus situado en la posición 1p13 también se encuentra implicado en la susceptibilidad a DM1. En esta región se localiza el gen PTPN22, que codifica la fosfatasa específica de linfocitos (LYP) que interviene en la inactivación de los linfocitos T a través de su unión a la quinasa Csk. El SNP situado en el codón 620 de la proteína supone un cambio de arginina por triptófano, habiéndose observado que el triptófano se encuentra más frecuentemente en DM1 que en controles, lo que sugiere que este aminoácido puede predisponer a esta enfermedad (Bottini et al., 2004).

Otros genes relacionados con la susceptibilidad a DM1 son SUMO4, IL2RA o IL4. Sin embargo, la influencia de cada uno de estos loci depende, tanto de la población como del genotipo de cada individuo (Howson et al., 2009; Ikegami et al., 2007).

2.2.3. FACTORES AMBIENTALES

El aumento exponencial en el número de casos de diabetes tipo I hace pensar que la influencia de los factores ambientales es mucho más importante de lo que se había pensando hasta el momento. Uno de ellos puede ser el clima, ya que los países nórdicos como Noruega, Finlandia y Suecia tienen una alta incidencia de DM1, de manera que los climas fríos podrían influir en la susceptibilidad a esta enfermedad (Aamodt et al., 2007).

Las infecciones víricas también son otro factor de riesgo importante en personas susceptibles a DM1, bien por la acción catalítica directa sobre las células β o bien por mimetismo molecular, de manera que muchas proteínas víricas tienen similitudes con proteínas propias. De esta forma, el sistema inmune reaccionaría sin discriminar entre los antígenos propios de los víricos (van der Werf et al., 2007).

El consumo de leche de vaca y de nitrosaminas presentes en la carne a edades tempranas, así como el consumo de cafeína durante el embarazo también se han relacionado con la aparición de DM1 en individuos susceptibles, aunque existen estudios contradictorios, de manera que no puede establecerse una relación clara entre estos factores y la DM1 (Bahillo et al., 2007; Fava et al., 1994).

2.2.4 COMPLICACIONES DE LA DM1

Entre las complicaciones más frecuentes de la DM1 se encuentran las metabólicas cetoacidóticas y las vasculares, macro y microangiopáticas.

a) Cetoacidosis

La cetoacidosis es una complicación aguda que se produce en pacientes no diagnosticados aún de DM1, o bien, en pacientes tratados cuando la inyección de insulina es insuficiente o hay un factor precipitante (infección, estrés, etc.) (Harrison, 2002).

La cetoacidosis tiene lugar como consecuencia del aumento de la concentración de cuerpos cetónicos en la sangre, lo que provoca una bajada del pH sanguíneo. Se añade una deshidratación por las pérdidas urinarias (poliuria) y digestivas (vómitos). En pacientes con DM1, la falta de insulina hace que la glucosa se acumule en sangre y no pueda ser captada por los tejidos. Esto provoca un aumento de la lisis de grasas y proteínas. Las grasas son degradadas hasta acetyl CoA, que a su vez se degrada hasta formar CO_2 y los cuerpos cetónicos acetoacetato, que se degrada a acetona en orina, y D-3-hidroxibutirato. Los síntomas son poliuria, polifagia, polidipsia, cefaleas,

vómitos y dolor abdominal. En los casos más graves se pueden producir convulsiones y la muerte. El tratamiento principal es la corrección de la deshidratación y de la hiperglucemia (Harrison, 2002).

b) Retinopatía diabética

La retinopatía diabética es una de las complicaciones crónicas más frecuentes. Normalmente las primeras lesiones comienzan a aparecer a los 7-10 años del diagnóstico y aproximadamente el 90% de los diabéticos tipo 1 desarrollan algún tipo de retinopatía. Las lesiones varían en intensidad a lo largo del tiempo (microaneurismas, hemorragias, exudados, edema macular, neoproliferación vascular), pudiendo abocar a ceguera en algunos casos (Harrison, 2002). La fotocoagulación es una opción terapéutica.

c) Nefropatía diabética

La nefropatía diabética afecta entre un 30-40% de los pacientes DM1, siendo más frecuente si la edad de aparición de la diabetes es antes de los 20 años, representando la primera causa de enfermedad renal. La primera manifestación es una microproteinuria persistente y progresiva, superior a 30 mg/24h, que resulta predictivo de la lesión renal así como de otras lesiones como las cardíacas (Harrison, 2002).

Entre las causas del origen de la nefropatía están la glucosilación de proteínas de la membrana basal del glomérulo. También la hiperfiltración glomerular y la elevación de la presión hidrostática glomerular pueden intervenir en la nefropatía diabética (Bach et al., 2000).

Un control glicémico intensivo, el uso de antihipertensivos y una dieta relativamente baja en proteínas son utilizadas como tratamiento contra la nefropatía. En los casos más graves se recurre a la diálisis y al trasplante cuando la insuficiencia renal es muy avanzada.

d) Angiopatías y neuropatías

La DM1 provoca daños en los vasos sanguíneos y en los nervios como consecuencia de la glicosilación no enzimática de las proteínas presentes en estas zonas, lo que provoca bien engrosamientos de la pared del endotelio y

estrechamiento de la luz, favorecido además por la frecuente dislipemia, en el caso de los vasos sanguíneos, o degeneración y pérdidas axonales así como desmielinización en el caso de los nervios. Son frecuentes el infarto de miocardio, la cardiopatía isquémica y la muerte súbita (Harrison, 2002).

Una de las consecuencias de las angiopatías y neuropatías es el pie diabético. Según el “Consenso internacional sobre pie diabético” de 1999, el pie diabético se define como una infección, ulceración, y destrucción de los tejidos profundos relacionados con alteraciones neurológicas y distintos grados de enfermedad vascular periférica en las extremidades inferiores. Se produce como respuesta a daño tanto en los nervios como en los vasos que irrigan al pie y que puede tener como consecuencia final gangrena y amputación del miembro. Aproximadamente el 15% de los pacientes con diabetes desarrolla pie diabético. Los síntomas son aparición de úlceras, insensibilidad y edemas. El tratamiento, además de un control glucémico estricto, es con antibióticos en el caso de que haya infección, eliminación del tejido necrosado y en los casos más graves amputación del miembro (Linden et al., 2008) .

2. 3 DIABETES MELLITUS TIPO 2

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) supone un grave problema de salud a nivel mundial. Se estima que en la actualidad hay 150 millones de personas afectadas y que esta cifra puede llegar a duplicarse en el año 2025. En España, la prevalencia de la enfermedad está en torno al 6,5% entre personas de entre 30 y 65 años. En el período comprendido entre 1993 y 2003 la prevalencia ha aumentado desde el 4,1% hasta el 5,6%. La mortalidad de la DM2 oscila entre 12,75 a 30,37 muertes por cada cien mil habitantes, dependiendo de la comunidad autónoma. La principal causa de muerte entre enfermos DM2 es por problemas cardiovasculares (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2007).

Los factores ambientales son cruciales para el inicio y desarrollo de la enfermedad, de manera que formas de vida sedentaria y la obesidad contribuyen en gran medida en la patogenia de la DM2.

2.3.1 FISIOPATOLOGIA DE LA DM2

La DM2 suele estar asociada a la obesidad y presenta dos factores claves para su desarrollo, la resistencia a la insulina y un aumento de la producción hepática de glucosa por el hígado (Harrison, 2002).

La resistencia a insulina provoca un aumento en la secreción de insulina para producir una respuesta cuantitativamente normal. El hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo, dianas principales de la insulina, no responden adecuadamente a la misma, de manera que el páncreas tiene que producir más cantidad para compensar su efecto. Con el paso del tiempo, las células β comienzan a fallar y se producen defectos en la secreción de insulina, produciéndose una intolerancia a la glucosa que tiene como consecuencia la hiperglucemia y la aparición de la DM2. No obstante, a la vez que la resistencia hay una insuficiente producción de insulina. Es probable que este fallo funcional de la célula β preceda a la resistencia. Se relaciona con una elevada presencia de lípidos en los compartimentos específicos donde la insulina ejerce su acción (Viollet et al., 2009).

Con el paso del tiempo, las células β mueren por apoptosis como consecuencia de una concentración excesivamente alta de glucosa y ácidos grasos libres. Es la teoría conocida como “glucolipotoxicidad” (Cnop et al., 2005). Las células β de ratón expuestas a altas concentraciones de glucosa, cambian la expresión de algunos genes, de manera que el GLUT2, la glucoquinasa y los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje reducen su expresión mientras que la hexoquinasa 1, la lactato deshidrogenasa y la glucosa-6- fosfatasa se sobreexpresan, al igual que factores anti y pro-apoptóticos (Weir et al., 2001). La expresión de genes que en condiciones normales no se expresan o lo hacen a muy baja intensidad, modificaría el fenotipo de las células β . Los mecanismos patológicos que los altos niveles de glucosa pueden activar son variados, como el aumento del estrés del retículo endoplasmático, estrés oxidativo o una elevación de los niveles de Ca^{2+} intracelular (Cnop et al., 2005).

La obesidad abdominal es un factor de riesgo para la DM2 y se correlaciona con mayor riesgo de pérdida de función de las células β debido a

una alta concentración de ácidos grasos libres (Wagenknecht et al., 2003). Una alta concentración de ácidos grasos libres reduce los niveles de secreción de insulina. Además, los ácidos grasos se acumulan en las células β , incrementándose los niveles de ceramida y, por tanto, de iNOS, causando como efecto final la apoptosis de las células dependiente de NO (Shimabukuro et al., 1997). En las células de insulinoma de ratón INS-1, niveles altos de oleato y palmitato aumentan el procesamiento alternativo del gen XBP-1 y la activación de los genes ATF-1 y la chaperona de retículo endoplasmático BiP, todos ellos relacionados con el estrés del retículo endoplasmático (Cnop et al., 2005). El retículo endoplasmático tiene, entre otras funciones, la esterificación de los ácidos grasos libres y cuando hay un exceso de los mismos, se ve desbordada su capacidad para esterificar, por lo que comienza un proceso en el cual se activan una serie de caspasas, dando lugar a la apoptosis de la célula. Por lo tanto, la combinación de una elevada concentración de glucosa y de ácidos grasos libres activa mecanismos patogénicos que conducen a la pérdida de función y, en muchos casos, a la muerte de las células β . La diferencia con respecto a la apoptosis de las células β que tiene lugar en la DM1, es que en la DM2 no hay infiltración de células de sistema inmune ni activación de las rutas promovidas por $IL1\beta$ o NF- κ B.

2.3.2 FACTORES GENETICOS

La DM2 es una enfermedad de carácter poligénico en el que el componente genético es muy importante, como muestran estudios hechos en familias y en gemelos univitelinos (Newman et al., 1987).

Son múltiples los estudios que se están realizando para averiguar las variantes génicas más frecuentes en diabéticos tipo 2. Los primeros estudios que se realizaron fueron estudios de asociación de genes candidatos en familias afectadas. Actualmente los estudios que se están realizando son los *genome-wide-association* (GWAs).

Los GWAs permiten estudiar múltiples SNPs dentro del genoma en el contexto de una enfermedad. Mediante este tipo de estudios se han localizado

varios loci localizados en las posiciones 6q, 1q, 18p, 2q, 20q, 17pq, 8p, 19q y 9q asociados a DM2 (Lyssenko y Groop, 2009). Sin embargo, el riesgo predictivo de estos loci para DM2 es bajo ($\text{odd ratio} < 1,1$). El loci que presenta un riesgo más alto y que, además, se replica en todas las poblaciones es el del factor de transcripción TCF7L2, que se localiza en la posición 10q25 y, entre otras funciones, codifica un factor de transcripción que interviene en la ruta de señalización Wnt y modula la expresión de Myc (Morin et al., 1997). Estudios realizados en diversas poblaciones del Reino Unido, Francia y Finlandia, muestran el alto riesgo que confiere la variante T del polimorfismo rs7903146 sobre la predisposición a diabetes tipo 2 (Grant et al., 2006; Groves et al., 2006; Scott et al., 2006;). El factor TCF7L2 interviene en el desarrollo de los islotes pancreáticos y modula la formación de adipocitos y la función de las células β . Ratones homocigotos nulos para TCF7L2 mueren poco después del nacimiento y presentan deficiencias en el desarrollo intestinal y ausencia de células madre epiteliales, que regulan entre otras cosas, la motilidad intestinal, el nivel de saciedad y la homeostasis energética (Morin et al., 1997). Por otro lado, la proteína TCF7L2 se une a la región promotora del gen que codifica la proteína similar a glucagón, GLP-1, que promueve el incremento en la secreción de insulina tras la ingestión de alimentos (Egan et al., 2002). Defectos en esta unión provoca el descenso en la secreción de insulina. Además, debido a que TCF7L2 regula la adipogénesis, alteraciones en este gen puede alterar los niveles de triglicéridos y afectar a la sensibilidad de la insulina sobre los tejidos (Prestwich y Macdougald, 2007).

Otros genes candidatos de susceptibilidad a diabetes tipo 2 son KCNJ11, que codifica el canal de potasio dependiente de ATP Kir6.1, SLC30A8, que codifica un transportador de zinc que interviene en el proceso de cristalización de la insulina, y PPARG (peroxidase proliferator-activated receptor γ), aunque este último confiere un riesgo mucho más bajo (Altshuler et al., 2000; Gloyn et al., 2003)

2.3.3 FACTORES AMBIENTALES

Durante los últimos años el cambio del estilo de vida y el estrés han provocado el aumento del sedentarismo y cambios en la forma y tipo de alimentación; todo ello ha tenido como consecuencia un aumento del número de casos de obesidad, hipertensión y diabetes.

El principal factor que contribuya a la aparición de DM2 es la obesidad. El aumento del consumo de grasas de origen animal y de azúcares por encima de las necesidades del organismo, hace que estos compuestos se acumulen en forma de grasa en el tejido adiposo y en otros órganos, como el hígado. El aumento de tejido adiposo, especialmente en la zona abdominal, puede ser causante de la resistencia a la insulina y de alteraciones en la secreción de la misma, como ya se ha comentado anteriormente.

La falta de ejercicio físico también se correlaciona con la DM2. La realización de ejercicio físico regularmente provoca un aumento de la sensibilidad de la insulina en el músculo e hígado y una mejor utilización de la glucosa por parte del músculo, debido a que el ejercicio aumenta la concentración del transportador GLUT4. Además, contribuye al descenso de la grasa corporal, de la presión arterial y del riesgo de padecer un accidente cardiovascular. Diversos estudios realizados en ratones así como estudios hechos sobre poblaciones susceptibles de padecer DM2, muestran que una falta de ejercicio físico contribuye a la aparición de obesidad y de resistencia a insulina y, con ello, de DM2 (Lima et al., 2009).

Un nivel socioeconómico bajo, la exposición a temperaturas demasiado altas o demasiado bajas, baja exposición solar, exposición a químicos como arsénico, plátanos y organoclorados, entre otros, también pueden ser factores ambientales de riesgo para DM2 (Latini et al., 2009).

2.3.4 COMPLICACIONES DE LA DM2

Las complicaciones de la DM2 son iguales a las de la DM1, excepto la cetoacidosis. Como complicación metabólica la que puede aparecer es el

estado hiperosmolar, pero la complicación más frecuente de la DM2 son los accidentes cardiovasculares, que también se ven agravados por la obesidad, la hipertensión y la hiperlipidemia presente en la mayoría de estos pacientes. En España, la DM2 representa la 6ª causa de muerte y entre el 50 y 80% de las muertes en diabéticos se deben a problemas cardiovasculares (Ministerio de Sanidad, 2007). El riesgo de sufrir una enfermedad cardiovascular en un diabético tipo 2 es de 2 a 4 veces superior a la de las personas sanas (Stamler et al., 1993).

La presencia de grasa abdominal libera una serie de factores pro-inflamatorios, como la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), que contribuyen a la formación de la placa de ateroma. Además, en estos pacientes los niveles de proteína C-reactiva, indicador inespecífico de proceso inflamatorio y de riesgo cardiovascular, también se encuentra elevada. La inflamación deteriora la vasodilatación de los vasos sanguíneos y provoca un aumento de la vasoconstricción debido, entre otros factores, a una alteración en la síntesis de endotelina 1, y/o una reducción de la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y/o de la disponibilidad biológica de óxido nítrico (NO) (Despres, 2001).

Por otra parte, la hiperglucemia y la resistencia a la insulina también contribuyen a la formación de la placa de ateroma, aunque los mecanismos implicados aun no son bien conocidos. Diversos estudios constatan que los individuos diabéticos tienen mayor susceptibilidad a la formación de placas de ateroma debido, entre otros factores, a una hiperactividad plaquetaria que facilita la formación de trombos. Los pacientes diabéticos presentan niveles anormalmente altos de tromboxano A₂, que es un potente activador plaquetario (Davi et al., 1996). Además, la hiperglucemia provoca la glucosilación no enzimática de proteínas de membrana de las plaquetas, como la P-selectina y la GP11b/111a que activa su agregación a las paredes de las arterias. La hiperglucemia también glucosila las LDL (*low density lipoprotein*) que hipersensibilizan las plaquetas al incrementar los niveles de Ca²⁺ y la producción de NO plaquetario (Ferroni et al., 2004). A todo ello se une el hecho de que los pacientes diabéticos presentan niveles reducidos de la prostaciclina PGL-2 y de NO endotelial, que actúan como vasodilatadores, de

manera que se favorece la agregación y la vasoconstricción, factores claves en el desarrollo de las placas ateromatosas y de la enfermedad cardiovascular (Vinik et al., 2001).

2.4 GENES DIANA RELACIONADOS CON SUSCEPTIBILIDAD A DM1 Y DM2

2.4.1 CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS

a) Gen IL1B

El gen IL1B se localiza en el cromosoma 2, en la posición q14, en un *cluster* génico donde también se hallan los genes IL1A e IL1RN, que codifican las proteínas IL1- α y la proteína agonista del receptor IL-1, respectivamente (Nicklin et al., 1994). IL-1 α tiene funciones muy similares a IL-1 β , mientras que IL-1RN codifica una proteína antagonista de la función de IL-1 α e IL-1 β (Voronov et al., 2003). IL-1 β es producido por los monocitos durante la fase aguda de la infección y está implicado en procesos relacionados con la angiogénesis, entre otros. Puede actuar bien como un factor proapoptótico o bien favoreciendo la proliferación celular (Eizirik y Darville, 2001).

IL-1 β es una de las citoquinas que interviene en los mecanismos fisiopatológicos de la DM1, bien a través de su interacción con IFN γ provocando un aumento en la producción de NO intracelular y una reducción en los niveles de Ca²⁺ del retículo endoplasmático, dando lugar a un estrés del retículo endoplasmático y la muerte por apoptosis de estas células, o bien mediante el efector NF- κ B induciendo la apoptosis a través de otras vías independientes (Lee et al., 2004c). Pacientes de diagnóstico reciente de diabetes tipo 1 muestran niveles elevados de IL-1 β , que, posteriormente, se van normalizando tras la insulino terapia (Kaizer et al., 2007).

Por otro lado, en individuos con síndrome metabólico los niveles de IL-1 β están aumentados, junto con los de IL-6 y TNF- α , las cuales son producidas por el tejido adiposo y contribuyen al desarrollo de la resistencia a la insulina de estos pacientes (Sethi y Hotamisligil, 1999). IL-1 β altera la fosforilación de

un residuo de tirosina de la subunidad β del receptor de la insulina, por lo que la insulina no puede activar la ruta atk/PKB y ERK1/2, lo que afecta negativamente al transporte de la glucosa y la lipogénesis. Además, IL-1 β reduce los niveles de adiponectina, una citoquina del tejido adiposo que mejora la sensibilidad a la insulina, facilitando el desarrollo de la resistencia a la insulina (Lagathu et al., 2006).

b) Gen IL6

El gen IL6 se localiza en el cromosoma 7, en la posición p21. La proteína que codifica pertenece a la superfamilia de citoquinas IL-6 que incluye a IL-11, oncostatina M y el factor inhibitorio de leucemias entre otras. Es sintetizada por macrófagos y linfocitos T en respuesta a daño tisular y estimula la diferenciación de linfocitos B y la producción de inmunoglobulinas. Su síntesis es inducida por IL-1 y TNF- α durante la fase aguda de la infección y es un regulador de la proliferación celular. Puede actuar bien como agente antiinflamatorio o como proinflamatorio (Kristiansen y Mandrup-Poulsen, 2005). La unión de IL-6 a su receptor, IL-6R, puede desencadenar dos vías de señalización, JAK/STAT y MAPK; la elección de una u otra vía dependerá del tipo celular, estado metabólico de la célula y factores externos (Kamimura et al., 2003).

El papel de IL-6 en la fisiopatología de la diabetes tipo 1 es desconocido. Se piensa que puede actuar induciendo la apoptosis de las células β , pero no hay evidencia de que sea la principal causa de la misma, de manera que son necesarios otros factores para que se produzca la destrucción de las mismas. En ratones NOD, IL-6 está presente antes y durante la fase de insulinitis y los niveles de esta citoquina son mayores en hembras que en machos (Kristiansen y Mandrup-Poulsen, 2005).

Con respecto a la diabetes tipo 2, se ha asociado altos niveles de IL6 con riesgo para el desarrollo de la diabetes tipo 2, y se ha estudiado su relación con la resistencia a la insulina en diferentes tejidos como el tejido adiposo, músculo esquelético e hígado. Hay una sobreproducción de IL-6 en el tejido adiposo de personas con resistencia a la insulina, que se relaciona con una menor secreción de esta hormona en respuesta a la glucosa (Bastard et

al., 2002). No se conoce con exactitud el mecanismo por el cual IL-6 puede estar implicado en la resistencia a la insulina, pero se especula que puede ser a través de SOCS3, un regulador negativo de la señalización de la insulina, ya que la expresión de SOCS3 está correlacionada con la de IL-6 (Rieusset et al., 2004).

c) Gen TNFA

El gen TNFA se localiza en el cromosoma 6q21.3, dentro de la región HLA. La proteína que codifica pertenece a la superfamilia de receptores transmembrana de clase II y, tras su síntesis, se une a la membrana donde es procesada y liberada en su forma soluble (Black et al., 1997). TNF α se une a los receptores TNFR1 y TNFR2 cuya expresión varía entre tejidos. TNF α es sintetizado por un gran número de tipos celulares destacando entre otros los macrófagos, células endoteliales y adipocitos. TNF- α es producida durante la fase aguda de la inflamación e induce apoptosis celular y también tiene efecto sobre el metabolismo lipídico, coagulación, resistencia a insulina y función endotelial. Su sobreproducción se relaciona con algunas enfermedades como el cáncer (Kim et al., 2009).

En el caso de la DM1, se piensa que TNF- α tendría una implicación directa en la muerte de las células β . Durante la fase de insulitis, los macrófagos y linfocitos TCD4⁺ producirían TNF α e IFN γ provocando una reacción inflamatoria aguda que activaría una serie de factores como STAT1 y, que en último término, conduciría a la activación de la apoptosis de las células β (Lee et al., 2004b). Además, la expresión de TNF α e IFN γ provoca el descenso en la expresión de genes que mantienen el fenotipo de las células β así como su regeneración, mientras que aumenta la expresión de genes relacionados con la apoptosis (Ortiz et al., 2008).

Con respecto a la DM2, TNF α , junto con IL-6 e IL-1 β , es sobreexpresado en el tejido adiposo de estos pacientes y está implicado en el mecanismo de resistencia a la insulina. La sobreexpresión de TNF α , al igual que en caso de IL-1 β , impide la fosforilación de residuos de tirosina en el receptor de la insulina, de manera que se impide la continuación de la cascada de reacciones. Además, aumenta la liberación de la lipasa sensible a

hormonas, de forma que hay mayor producción de ácidos grasos libres que también contribuyen al desarrollo de la resistencia a la insulina y la DM2 (Sethi y Hotamisligil, 1999).

d) Gen CD40

El gen CD40 se localiza en el brazo largo del cromosoma 20, en la posición q12. Se trata de un receptor de superficie que pertenece a la superfamilia de los receptores TNF. Su expresión se encuentra principalmente en linfocitos B, linfocitos T y células presentadoras de antígenos, aunque también se encuentra presente en otros tipo celulares, como células endoteliales y células ductales del páncreas (Karmann et al., 1995; Vosters et al., 2004). Interviene en la proliferación de células B así como en cambio de isotipo de la inmunoglobulinas (Kawabe et al., 1994). Su principal ligando es CD40L (CD154) y su unión al mismo activa diferentes rutas, aunque la principal es a través de NF- κ B (Tsukamoto et al., 1999).

La expresión de CD40 fuera del sistema inmune se asocia a inflamación. En el caso de la DM1, se ha observado que la expresión de CD40 tanto en las células β como en las células ductales del páncreas, activa la transcripción de una serie de citoquinas, como IL-8 y TNF- α , que pueden contribuir al progreso de la DM1 (Vosters et al., 2004). Por otra parte, se ha observado que en ratones NOD la población de linfocitos TCD4⁺ con alto nivel de expresión de CD40 y baja expresión de CD4 media en el proceso autoinmune de la diabetes (Wagner et al., 2002). Un estudio reciente también muestra que poblaciones de linfocitos B peritoneales con alta expresión de CD40 migran más rápidamente a los nódulos linfáticos pancreáticos y que exponen más eficientemente anticuerpos anti-insulina (Alam et al. 2010).

Los niveles del ligando de CD40 (CD40L) son superiores en individuos con DM2 e intolerancia a la glucosa. Variaciones en la expresión del mismo se correlacionan con diferencias en la sensibilidad a la insulina (Basili et al., 2006). CD40 se expresa en tejido adiposo y sus niveles de expresión se incrementan durante la adipogénesis. La unión a CD40L provoca la activación de la ruta MAPK a través de NF- κ B, lo que conduce a la producción de algunas adipoquinas implicadas en la resistencia a la insulina como IL-6 y TNF- α , y a

una reducción del transporte de glucosa dependiente de insulina como consecuencia de una reducción en la producción del sustrato del receptor de insulina IRS1 y del transportador GLUT4 (Poggi et al., 2009)

2.4.2 CITOQUINAS ANTIINFLAMATORIAS

a) Gen IL4

El gen IL4 se localiza en el brazo largo del cromosoma 5, en la posición q31, en una región que contiene los genes de otras citoquinas antiinflamatorias, como IL-5 e IL-13. IL-4 es una glucoproteína sintetizada principalmente por basófilos activados, y participa en la activación de los linfocitos Th2, principales mediadores de la inmunidad humoral (Kotaniides y Reich, 1996).

El papel de esta citoquina en el desarrollo de la DM1 está siendo muy estudiado debido a que es un regulador negativo de los procesos autoinmunes. Estudios realizados en ratones diabéticos no obesos (NOD) a los que se les administra IL-4 solo o en combinación con IL-10, presentan un bloqueo del desarrollo de la diabetes debido a una menor infiltración de linfocitos en el páncreas (Rehman et al., 2008). La mayor expresión de IL-4 produce un aumento de las células Th2 en detrimento de las células Th1, principales mediadores de la insulinitis. Además, también se produce un aumento en el número de células T reguladoras (Treg) encargadas de la eliminación de las células T autorreactivas responsables del inicio de la enfermedad (Sgouroudis y Piccirillo, 2009).

Con respecto a la DM2, IL-4 puede participar en la fisiopatología de la misma a través de los macrófagos del tejido adiposo y las células Kupffer del hígado. Estos macrófagos propios del tejido, exhiben una reducida actividad inflamatoria y se piensa que una activación alternativa de los mismos mejora la sensibilidad a la insulina, como se ha observado en estudios realizados en ratones, aunque los mecanismos por los cuales se produce este efecto todavía son desconocidos. IL-4, junto a IL-13 e IL-10, participarían en la activación alternativa de estos macrófagos activando la transcripción del factor

PPAR γ , que interviene en el metabolismo lipídico de estas células y es necesario para la maduración de las mismas (Odegaard y Chawla, 2008). Por otra parte, IL-4 se ha asociado con la obesidad, uno de los factores de riesgo para el desarrollo de la DM2, a través de la inducción de la expresión de la hormona PMCH en el hipotálamo, la cual se encarga de regular la ingesta calórica y la homeostasis energética (Orihara et al., 2009).

b) Gen IL4R

El gen IL4R se localiza en el cromosoma 16p21 y codifica la cadena α del receptor de IL4. Se trata de un receptor transmembrana de clase I que pertenece a la superfamilia de receptores de citoquinas tipo I. Presenta tres regiones: el dominio extracelular que comprende de los exones 3 a 7, un dominio transmembrana codificado por el exón 9 y un dominio intracelular que comprende los exones 10 a 12 (Kruse et al., 1999). IL4R puede unirse tanto a IL4 como a IL13 y esta unión regula la producción de inmunoglobulinas de clase E así como el desarrollo de linfocitos Th2. Existe una isoforma soluble de IL4R que se piensa que puede actuar como antagonista de IL4 (Bergin et al., 2006).

Su papel dentro de la fisiopatología de la DM1 y la DM2 es similar a la que desempeña IL4. La unión de esta citoquina a IL4R provoca la fosforilación del mismo, lo que activa la cascada de reacciones de la ruta JAK/STAT que conduce a la activación de los linfocitos Th2 y de los macrófagos residentes del tejido adiposo y del hígado, dando lugar a los efectos que se han comentado anteriormente. Existen estudios que relacionan algunos SNPs individuales y haplotipos dentro de este gen con susceptibilidad a DM1 y DM2, aunque también existen estudios en los cuales no encuentran relación entre este gen y el riesgo a padecer diabetes, por lo que su función como marcador de susceptibilidad puede variar dependiendo de las poblaciones (Bugawan et al., 2003; Erlich et al., 2009).

2.4.3 GEN IL8

El gen de la interleucina 8 (IL8) se localiza en el cromosoma 4, en la posición q12-13. La proteína codificada es una citoquina perteneciente a la familia de quimocinas CXC, que contiene una región de unión a heparina. Su principal acción es mediar en la activación y migración de neutrófilos y macrófagos a la zona de infección (Hull et al., 2001).

La expresión de IL-8 junto con la de otras quimiocinas, como MCP-1, es inducida por CD40 en las células ductales del páncreas, que se encuentran adyacentes a los islotes pancreáticos, por lo que puede contribuir a la quimiotaxis de macrófagos y linfocitos en la DM1 (Klein et al., 2008). Por otra parte, se ha comprobado que IL-8, junto con IL-6, IL-1 β y TNF- α , se sobreexpresa en el tejido adiposo de personas obesas y que esto contribuye a la resistencia a la insulina que se manifiesta en estos pacientes (Hoch et al., 2008). Sin embargo, IL-8 parece estar implicada en algunas de las complicaciones de la diabetes, como la nefropatía y la retinopatía diabética, ya que se encuentran niveles elevados de IL-8 tanto en la orina como el humor vítreo de los pacientes afectados por ambas complicaciones (Bian et al., 2001; Tashiro et al., 2002).

2.4.4 GEN CTLA4

El gen CTLA4, localizado en el brazo largo del cromosoma 2, en la posición q33, codifica un receptor perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas. La proteína contiene un péptido líder, un dominio extracelular V, un dominio transmembrana y tallo citoplasmático con dos sitios potenciales de fosforilación. Se expresa en linfocitos T activados y, cuando se une al ligando B7, da lugar a una respuesta inhibitoria que evita la proliferación de estas células. CTLA4 presenta una alta homología con CD28 y ambos compiten por los mismos ligandos, pero CD28 tiene un efecto contrario a CTLA4 ya que induce activación y proliferación de los linfocitos T (Alegre et al., 2001).

El gen CTLA4 se ha estudiado como posible gen marcador de susceptibilidad para la DM1 debido a su papel inhibidor en la activación de los linfocitos T, causantes de la invasión y destrucción de las células β . Diferentes estudios de asociación marcan el loci IDDM12 (correspondiente al gen CTLA4) como marcador de riesgo para DM1 (Ahmedov et al., 2006; Lee et al., 2000). Con respecto a la DM2, no se ha encontrado ninguna asociación entre este gen y susceptibilidad a la misma, ni se ha relacionado con ninguno de los procesos característicos de esta enfermedad (Rau et al., 2001).

2.4.5 GEN PPARG

El gen PPARG, localizado en el cromosoma 3p25, codifica un receptor nuclear de tipo II perteneciente a la superfamilia de los receptores nucleares de hormonas. Existen dos isoformas, PPAR γ 1 y PPAR γ 2, las cuales se diferencian en 28 aminoácidos en el extremo N-terminal de la proteína. Ambas isoformas se expresan principalmente en adipocitos y, en menor medida, en bazo, cerebro, hígado y músculo esquelético, entre otros (Elbrecht et al., 1996). PPAR γ dimeriza con los receptores retinoides X (RXR) regulando la transcripción de genes relacionados con el metabolismo de glúcidos y lípidos en adipocitos. Además, la expresión de PPAR γ es necesaria para la maduración de los adipocitos y macrófagos residentes del tejido adiposo. Estudios de GWAs lo confirman como uno de los loci de susceptibilidad a DM2 en la mayoría de las poblaciones (Saxena et al., 2007; Zeggini y McCarthy, 2007).

PPAR γ puede tener un papel protector para el desarrollo de la DM1 ya que regula el metabolismo lipídico de macrófagos, controlando su respuesta inflamatoria, e inhibe la secreción de IL-2 por parte de linfocitos T citotóxicos, lo que impide la proliferación de los mismos (Raj et al., 2009). Por otra parte, PPAR γ reduce los niveles de expresión de NF- κ B, uno de los mediadores de la apoptosis en las células β , al evitar la degradación del factor I κ B, un inhibidor de NF- κ B, impidiendo el progreso de la apoptosis en estas células (Kim et al., 2007).

La función de PPAR γ en la DM2 fue descubierta a partir del uso de las glitazonas como antidiabéticos orales, que actúan como ligandos de PPAR γ y ejercen un efecto beneficioso sobre la sensibilización a la insulina. PPAR γ no solo interviene en la diferenciación de los adipocitos, sino que también facilita el flujo de ácidos grasos hacia el interior de los mismos. Además, activa la transcripción del transportador GLUT4, por lo que también facilita el transporte de glucosa al interior de estas células. La carencia de PPAR γ en ratones incrementa la acumulación de grasa en músculo e hígado, lo que perjudica la sensibilización de estos tejidos a la insulina y, por tanto, permite el desarrollo de la resistencia a insulina (Lehrke y Lazar, 2005). Además, PPAR γ incrementa la expresión de adiponectina a la vez que reduce los niveles de citoquinas inflamatorias, como IL-6 y TNF α (Rosen y Spiegelman, 2001).

2.4.6 GEN TCF7L2

El gen TCF7L2 se localiza en el brazo largo del cromosoma 10, en la región q25, y codifica un factor de transcripción que interviene en la ruta de señalización Wnt. La proteína presenta 596 aminoácidos y contiene un dominio CTNNB1 de unión a β -catenina y un dominio SOX-TCF-HMG de unión a DNA. Cuando la ruta Wnt se activa, β -catenina se une a TCF7L2 formando un complejo que se dirige al núcleo, donde activa la transcripción de distintos genes entre los que destaca la proteína similar a glucagón, GLP-1, una hormona intestinal que se secreta tras la ingestión de alimentos y favorece la síntesis y liberación de la insulina (Egan et al., 2002). Además, TCF7L2 también interviene en la regulación de la adipogénesis, ya que se han encontrado secuencias de unión al complejo β -catenina/TCF7L2 en los promotores de CEBPA y PPARG (Prestwich y Macdougald, 2007).

En 2006 Grant y colaboradores encontraron una fuerte asociación entre algunos polimorfismos en TCF7L2 y DM2 en la población de Islandia (Grant et al., 2006). Desde entonces, esta asociación se ha encontrado en la mayoría de las poblaciones mundiales, poniendo de manifiesto que variantes génicas de este gen representan el mayor factor de riesgo para DM2 (Tong et al., 2009). El efecto que ejercen estos polimorfismos sobre la proteína así como su efecto

sobre la DM2 sigue sin estar completamente esclarecidos, aunque se piensa que pueden estar asociados a una reducción de la transcripción de GLP-1 o que afecten a la adipogénesis y sensibilización de la insulina (Egan et al., 2002). Con respecto a la DM1, no se han encontrado estudios que relacionen este gen con el inicio o progreso de la enfermedad.

2.4.7 GENES RELACIONADOS CON EL FUNCIONAMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR

a) Gen EDN1

El gen EDN1 se localiza en el brazo corto del cromosoma 6, en la posición p24 y codifica una de las proteínas vasoconstrictoras más potentes que se han descrito hasta el momento, la endotelina 1. EDN1 se sintetiza como preproendotelina y, posteriormente, experimenta un proceso de maduración que da lugar a la proteína funcional. EDN1 se expresa principalmente en el endotelio de los vasos sanguíneos, aunque también se ha encontrado expresión en las células del músculo liso y, en menor medida, en macrófagos, y cardiomiocitos (Resink et al., 1990). EDN1 se une a dos tipos de receptores acoplados a proteínas G, ET_A y ET_B. El primero de ellos se localiza en las células del músculo liso mientras que ET_B se encuentra en el endotelio y, a través de su unión a EDN1, media la vasoconstricción de los vasos sanguíneos (Seo et al., 1994).

Los niveles de expresión de EDN1 están elevados en pacientes con DM1 y DM2. Estudios realizados en ratones NOD muestran que ya en el estado prediabético hay una menor contracción en respuesta a EDN1 en tanto que un bloqueo del receptor ET_A previene la aparición de la diabetes en estos ratones (Ortmann et al., 2005). Por otro lado se piensa que puede contribuir al desarrollo de la resistencia a la insulina tanto en adipocitos como en el endotelio a través de un incremento de la actividad de la ruta de las MAPK en estas células. La elevada fosforilación de ERK1/2 provoca un descenso de la expresión de IRS-1, una de las moléculas que interviene en la cascada de señalización de la insulina (Gogg et al., 2009). Además, EDN1 interviene en el

desarrollo de las complicaciones más frecuentes de la diabetes, como la retinopatía, la nefropatía y otras microangiopatías debido a su efecto vasoconstrictor (Kalani, 2008).

b) Gen VEGF

El gen VEGF se localiza en el cromosoma 6, en la posición p12 y codifica un factor implicado en la angiogénesis y vasculogénesis, así como en la división y migración de las células endoteliales. También es un factor quimiotáctico para macrófagos y granulocitos, además de estar implicado en el desarrollo y homeostasis de las células neuronales (Raab y Plate, 2007). El gen VEGF presenta procesamiento alternativo de los mismos dando lugar a varias isoformas, entre las cuales la más estudiada es VEGFA. VEGF se une a los receptores VEGF-R1 y VEGF-R2, ambos con actividad tirosín-quinasa, que se localizan principalmente en las células endoteliales y en menor medida en macrófagos y neuronas (Wirostko et al., 2008).

VEGF-A se sintetiza en las células endoteliales vasculares presentes en los islotes pancreáticos y facilita la formación de vasos sanguíneos que permiten la secreción de la insulina al torrente circulatorio (Lammert et al., 2003). Se considera un factor de protección del páncreas ya que facilita la supervivencia de las células β trasplantadas por un aumento de la angiogénesis y la resvascularización del tejido, lo que puede prevenir el inicio de la DM1 y de la DM2 (Del Bo et al., 2006; Watada, 2010). Sin embargo, VEGF-A ha sido más estudiado en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes, ya que está implicado en el inicio y desarrollo de la retinopatía diabética, así como de la nefropatía diabética. En ambos casos los niveles de VEGF se encuentran elevados en estos pacientes (Wirostko et al., 2008).

c) Gen NOS3

El gen NOS3 se localiza en el brazo largo del cromosoma 7, en la posición q36, y codifica una enzima que se encarga de sintetizar el óxido nítrico (NO) a partir del grupo guanido de la arginina en el endotelio de los vasos sanguíneos. El promotor del gen carece de la típica caja TATA, aunque contiene otros elementos como SP-1 y GATA, que permiten su regulación por

estrés, ejercicio físico e hipoxia (Chatterjee et al., 2008). Además, la actividad de la enzima NOS3 es regulada principalmente por Ca^{2+} y por fosforilación, aunque puede sufrir otras modificaciones postraduccionales (Michel y Vanhoutte, 2010).

El NO es uno de los señalizadores celulares más importantes y su papel en la fisiopatología de la DM1 y de la DM2, así como en sus complicaciones parece evidente, aunque los resultados que se desprenden de los diferentes estudios realizados a veces resultan contradictorios, por lo que su función no está todavía bien elucidada. En la DM1, NO es producido tanto por macrófagos como por las propias células β bajo la estimulación de algunas citoquinas, como IL-1 β , o TNF- α . NO interacciona con algunas enzimas mitocondriales reduciendo la capacidad oxidativa de la célula β , lo que impide la liberación de la insulina y conduce a la apoptosis de la célula (Corbett et al., 1993). Otros estudios muestran que NO es un regulador negativo de la liberación de insulina en respuesta a glucosa y L-arginina, y que bajo condiciones de hiperglucemia se produce un incremento de la actividad tanto de NOS3 como de NOS2, lo que puede provocar una disfunción de NO y contribuir al desarrollo de la DM2 (Mosen et al., 2008). Además, la resistencia a la insulina impide la activación de la ruta PI3K, que activa la proteína AKT que, a su vez, activa NOS3 por fosforilación (Li et al., 2009). Una bajada en los niveles de NO provoca una mayor constricción de la filia vascular y un aumento en los niveles de las especies de oxígeno reactivo, que contribuyen al daño endotelial y, por tanto, a la formación de placas de ateroma y enfermedad cardiovascular. La producción de NO también está implicada en otras complicaciones de la diabetes como la retinopatía y la nefropatía.

2.5 DIABETES MODY

La diabetes MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*) es un tipo de diabetes que se caracteriza por una aparición temprana, normalmente antes de los 25 años y en algunos casos en la infancia, y por presentar un patrón de herencia autosómico dominante. La diabetes MODY se debe a mutaciones de

genes presentes en las células β . Representa un 5% de los casos de DM2 y se piensa que hasta un 10% de los diabéticos tipo 1 que no son portadores de HLA de riesgo, son en realidad diabéticos MODY (Moller et al., 1998).

La enfermedad presenta un inicio asintomático y suele detectarse tras un análisis rutinario. Los criterios clínicos para el diagnóstico de diabetes MODY son la hiperglucemia, dos familiares de primer grado afectados por la enfermedad, ausencia de anticuerpos contra células β así como de cualquier otro tipo de autoinmunidad y ausencia de obesidad o síndrome metabólico. En algunos casos se manifiesta por diabetes neonatal.

La diabetes MODY es una enfermedad monogénica causada por mutaciones en genes relacionados con el funcionamiento de las células β del páncreas (Figura 8). Existen seis tipos de diabetes MODY, MODY1 (HNF4 α), MODY2 (GCK), MODY3 (HNF1 α), MODY4 (IPF-1), MODY5 (HNF1 β) y MODY6 (NeuroD1). La diabetes MODY más frecuente en España es la tipo MODY2 (hasta un 80% de los casos de MODY), seguido de la MODY3 (hasta un 20%) y la MODY1 (1-3%) (Barrio et al., 2002). El resto de diabetes MODY son muy poco frecuentes en todas las poblaciones en general. Existe un séptimo tipo de diabetes MODY, MODYX, en la cual los pacientes cumplen todos los criterios para diabetes MODY, pero no se conoce el loci que está mutado. Este tipo de MODY es el más frecuente en algunos países China y Alemania (Xu et al., 2005; Ziemssen et al., 2002).

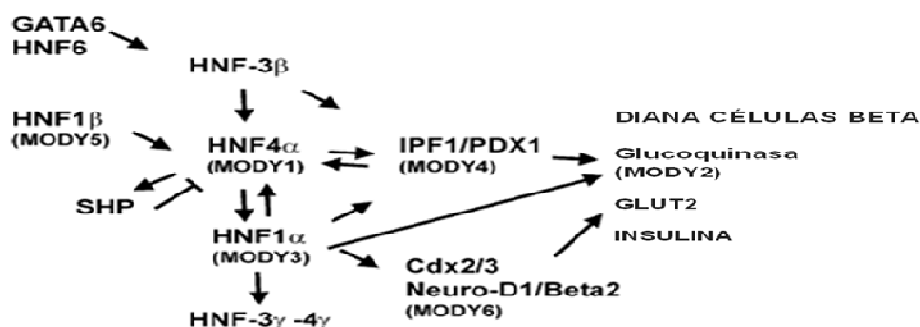


Figura 8. Esquema de los factores de transcripción que intervienen en el funcionamiento y expresión de genes fundamentales de las células β . Mutaciones en alguno de estos factores de transcripción alteran la función de estas células dando lugar a la aparición de diabetes MODY.

2.5.1 DIABETES MODY 1

La variante MODY 1 es una forma poco frecuente de diabetes y representa alrededor del 1 al 3% de todos los casos de MODY. Fue descrita por primera vez por Fajans y colaboradores en 1989 a través del estudio de la familia RW, que incluía 360 miembros a lo largo de 6 generaciones, de los cuales 74 estaban afectados de diabetes de aparición temprana (Fajans, 1989). Estudios de linaje mostraban una clara asociación entre la enfermedad y el cromosoma 20. Posteriormente, se localizó la mutación Q268X en el gen HNF4 α (20q13) y que ésta se segregaba con la diabetes (Yamagata et al., 1996a).

La diabetes MODY 1 es una forma grave de diabetes. Los pacientes presentan una hiperglucemia severa que tiende a incrementarse con el tiempo, debido a que la cantidad de insulina secretada en respuesta a glucosa va decreciendo. Además, también se encuentran alteradas la secreción de glucagón y de polipéptido pancreático, por lo que no solo hay disfunción de las células β , sino también del resto de células endocrinas del páncreas. Por otra parte, en algunos pacientes también hay alteraciones del metabolismo lipídico y puede haber una reducción de hasta el 50% de la concentración de triglicéridos en suero y hasta del 25% de la concentración de las apolipoproteínas AII y CIII (Lehto et al., 1999a).

Las complicaciones de la diabetes MODY 1 son iguales a las de la DM1 y DM2, sobre todo microangiopatías en la retina y en el riñón. El tratamiento, además de la dieta y el ejercicio físico, se realiza administrando drogas hipoglucemiantes, especialmente las sulfonilureas, aunque hasta el 40% de los pacientes requieren tratamiento con insulina al cabo de unos años.

a) Características del gen HNF4A

El gen HNF4 α (OMIM*600281) se localiza en el cromosoma 20, en la posición q12- q13.1 y se extiende a lo largo de 73871 pb. Presenta dos promotores alternativos, P1 y P2, separados entre sí por 46 kb. El promotor P1 es utilizado principalmente en las células hepáticas mientras que el promotor P2 representa el mayor sitio de inicio de la transcripción en el páncreas (Figura

9). El promotor P2, al igual que P1, contiene sitios de unión funcionales para los factores de transcripción HNF1 α , HNF1 β e IPF-1, todos ellos genes relacionados con la diabetes MODY (Ferrer, 2002). En una familia se localizó en el promotor P2 una mutación (-146 T>C) que segregaba con la enfermedad. Estudios posteriores mostraban que esta mutación afectaba a su unión con el factor IPF-1 (Thomas et al., 2001). Otra mutación que segrega con pacientes diabéticos se encuentra en el promotor P2 (-181 G>A) y afecta a su unión con HNF1 α (Thomas et al., 2001).

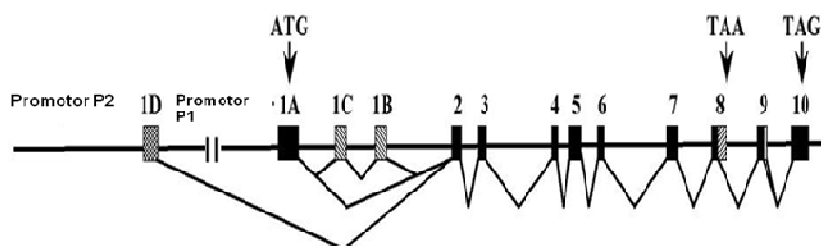


Figura 9. Representación de la estructura del gen HNF4 α humano, así como del uso de los distintos promotores y del procesamiento de los exones.

El gen tiene un total de 12 exones y presenta un procesamiento alternativo de los mismos (Figura 10). Hasta el momento hay descritas 9 isoformas. Las isoformas 4 α 7, 4 α 8 y 4 α 9 se expresan fundamentalmente en el páncreas, aunque también se encuentra expresión de las mismas en el hígado, mientras que las isoformas 4 α 1, 4 α 2 y 4 α 3 son específicas del hígado (Huang et al., 2008).

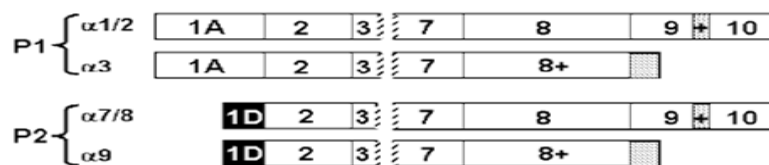


Figura 10. Esquema de las isoformas del gen HNF4 α . Las isoformas generadas a partir del promotor P1 son las isoformas 4 α 1, 4 α 2 y 4 α 3 y se expresan fundamentalmente en hígado. Las isoformas que utilizan el promotor P2 son las isoformas 4 α 7, 4 α 8 y 4 α 9 que son homólogas a las isoformas de P1 pero cuya expresión tiene lugar en el páncreas

b) Características de la proteína HNF4 α

La proteína HNF4 α es un factor de transcripción que pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares esteroideos y tiroideos, concretamente a la subfamilia NR2 (NR2A1). Es un receptor huérfano porque no se conoce aún ningún ligando específico, aunque varios estudios muestran que los ácidos grasos esterificados con CoA, y con menor afinidad los ácidos grasos libres de cadena larga, se unen con alta especificidad a la región de unión a ligando de la proteína y participan en la activación de la misma (Petrescu et al., 2005). HNF4 α actúa como homodímero para su unión al DNA, donde reconoce repeticiones directas AGGTCA separadas entre sí por uno o dos nucleótidos (DR1 o DR2) y localizadas en el surco mayor de la cadena de DNA. Recientemente también se ha observado su unión a un elemento repetitivo invertido separado por 8 nucleótidos en el promotor del gen de la apolipoproteína A-V (Priour et al., 2005).

La isoforma completa contiene 474 aminoácidos y un peso molecular de 52,78 KDa, siendo su estructura muy similar al resto de receptores nucleares esteroideos. El extremo N-terminal de la proteína contiene un dominio de activación (AF-1), el dominio de unión a DNA, que presenta dos dedos de zinc muy conservados en la evolución y en los cuales el zinc está coordinado con dos cisteínas, y una región bisagra. En la parte central de la proteína se encuentra el dominio de unión a ligando y un segundo dominio de activación (AF-2). La región C-terminal contiene el dominio F, que es necesario para la estabilidad del dominio de unión a ligando y donde se encuentra el dominio de transactivación (Figura 11) (Petrescu et al., 2005).



Figura 11. Esquema de la estructura de la proteína HNF4 α . La parte N-terminal contiene el dominio de unión a DNA, la parte central, el dominio de unión a ligando y la parte C-terminal el dominio de transactivación.

La proteína HNF4 α se expresa principalmente en hígado, páncreas, intestino y riñón. Los ratones *knockout* para HNF4 α presentan letalidad embrionaria ya que no completan la gastrulación debido a una desregulación del endodermo extraembrionario (Duncan et al., 1997).

c) Funciones de HNF4 α

El factor HNF4 α es clave para el desarrollo y funcionamiento del hígado, ya que regula la expresión de numerosos genes implicados en la función de este órgano (Odom et al., 2004). HNF4 α comienza a expresarse durante el desarrollo de los divertículos hepáticos del ratón en el estado embrionario E8.7 y es fundamental para la diferenciación del hígado ya que genes específicos para la función hepática, como los genes de las apolipoproteínas A1, AIII, B, CIII, transferrina y la proteína de unión a retinol, no se expresan en ausencia de HNF4 α , como tampoco el factor HNF1 α ni el receptor de pregnanos X (PXR). HNF4 α puede actuar a través del reclutamiento de coactivadores que intervienen en la remodelación de la cromatina, como CBP/p300 o SRC-1, facilitando el inicio de la transcripción en los genes diana (Li et al., 2000). HNF4 α también está implicado en la especialización de las células hepáticas según su posición dentro del hígado, para lo que interacciona con la ruta de señalización Wnt/ β -catenina (Colletti et al., 2009).

Durante la etapa adulta, HNF4 α regula genes implicados en metabolismo de carbohidratos, como la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), la glucosa 6 fosfatasa, la aldolasa B y el receptor de proliferación del peroxisoma γ (PPAR γ), así como en el metabolismo de lípidos, como las apolipoproteínas apoA1, apoCIII, apoAII, apoAV, CYP7A1 (colesterol 7 α -hidrolasa). También regula genes relacionados con la eliminación de xenobióticos, como el citocromo p450 o factores relacionados con la coagulación (Tarumi et al., 2002; Wang et al., 2000).

La función de HNF4 α en el páncreas es menos conocida que su función en el hígado. Durante el desarrollo embrionario del ratón la expresión de HNF4 α comienza a la vez que la formación del páncreas en el día E9.5, junto con otros factores imprescindibles para la formación del mismo, como Pdx1,

Ngn3 y HNF1 β , y se piensa que puede estar implicado en la formación de las células endocrinas del páncreas, aunque su papel no está bien definido. Se piensa que puede ser a través de la regulación de los factores HNF1 α y HNF1 β (Nammo et al., 2008).

Estudios realizados en ratones en los que se inhibe específicamente la expresión de HNF4 α en las células productoras de insulina han mostrado que hay una menor producción de ATP por parte de las células β , y que esto se debe a una menor expresión de algunos genes relacionados con el metabolismo glucídico y con la secreción de insulina, como la subunidad E1 de la α -cetoglutarato deshidrogenasa (OGDH), la aldolasa B o el transportador de glucosa GLUT2, entre otros (Wang et al., 2000). Otro estudio muestra que la carencia de HNF4 α afecta a los canales de K⁺ dependientes de ATP, de manera que la secreción de insulina puede verse afectada. Sin embargo, los niveles de expresión de los canales de K⁺, como Kir6.2, no se ven afectados por la falta de HNF4 α , de forma que tiene que haber otro mecanismo por el cual HNF4 α los regule (Miura et al., 2006).

d) *HNF4 A y su implicación en la diabetes MODY*

La primera mutación descrita en HNF4A relacionada con diabetes MODY fue una transición de citosina por timina que generaba un codón de stop en la posición 268 (Yamagata et al., 1996a). Hasta el momento se han descrito 41 mutaciones, de las cuales 30 están relacionadas con diabetes MODY, la mayoría de tipo *missense* (Figura 12). Existen también polimorfismos de HNF4A que se asocian a diabetes mellitus tipo 2 como la mutación p.R323H (Oxombre et al., 2002; Price et al., 1999).

Algunas mutaciones, como los cambios p.D126H y p.D126Y, afectan al dominio de unión al DNA de HNF4 α , de manera que su capacidad de transactivación sobre HNF1 α o LPK (piruvato kinasa) se ven afectadas por estas mutaciones. Además, estas mutaciones también afectan a la expresión de las apolipoproteínas apoAII y apoCIII (Oxombre et al., 2002). Otras mutaciones como p.K99fsdelAA, también alteran la función de las células β ya que la secreción de insulina está marcadamente reducida frente a individuos control. Además, también presentan alteración del metabolismo lipídico ya que las

concentraciones de triglicéridos y de apoCIII son significativamente más bajas comparados con sujetos no diabéticos (Lehto et al., 1999b).

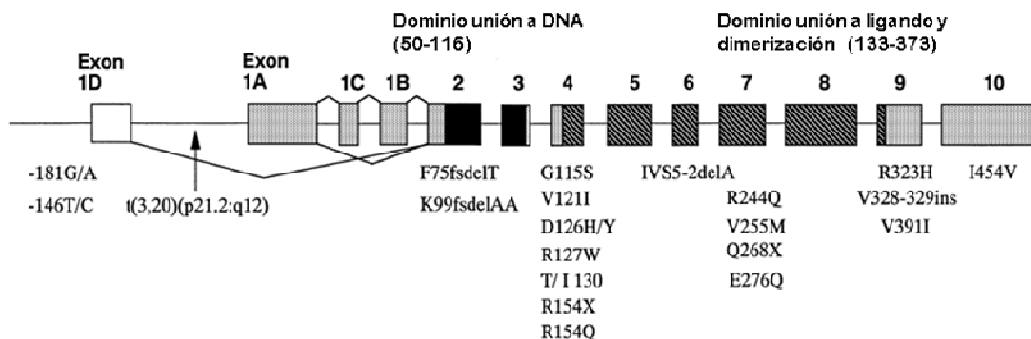


Figura 12. Esquema de todas las mutaciones descritas hasta el momento en el gen HNF4α. Se observa que las mutaciones se distribuyen a lo largo de todo el gen incluyendo las regiones promotoras (Yamagata, 2003).

Mutaciones heterocigotas de HNF4A también se han asociado a macrosomía, hiperinsulinemia e hipoglucemia en recién nacidos que posteriormente evolucionan hacia un fenotipo diabético (Pearson et al., 2007). Este hecho es muy parecido al que se ha descrito en mutaciones de los canales de K⁺ dependientes de ATP, donde los recién nacidos presentan hiperinsulinemia e hipoglucemia como consecuencia de la actividad descontrolada del canal de K⁺, produciéndose posteriormente el agotamiento del mismo, lo que conduce a la aparición de diabetes (Huopio et al., 2003).

2.5.2 DIABETES MODY 2

La diabetes MODY 2 es el tipo de diabetes MODY más frecuente en España representando hasta el 80% de los casos. En 1992 Froguel y colaboradores relacionaron el gen de la glucoquinasa, localizado en el brazo corto del cromosoma 7, con diabetes de aparición temprana y herencia autosómica dominante en 16 familias en Francia (Froguel et al., 1992).

La diabetes MODY 2 es una forma leve de diabetes que presenta hiperglucemias leves, que generalmente no superan los 150 mg/dL, y que en

muchos casos es asintomática. Este tipo de diabetes MODY aparece a edades más tempranas que el resto, normalmente en la infancia. No suele presentar complicaciones severas y el tratamiento suele ser dieta y ejercicio, no siendo necesaria la utilización de hipoglucemiantes orales o insulina. Hasta el 50% de las mujeres embarazadas portadoras de mutaciones en el gen GCK presentan diabetes gestacional y recién nacidos con bajo peso en el nacimiento debido a una disminución en la secreción de insulina (Froguel et al., 1993). Mutaciones homocigotas de este gen dan lugar a la diabetes neonatal, así como bajo peso en el nacimiento (Weedon et al., 2006).

a) Características del gen GCK

El gen de la glucoquinasa (GCK) (OMIM*138079) se localiza en el cromosoma 7, en la posición 7p15-p13 y se extiende a lo largo de 45169 pb. Presenta 10 exones y dos promotores alternativos, neuroendocrino y hepático, separados entre sí 30 kb. En el promotor neuroendocrino hay un elemento de control, GCCACCAG, homólogo al encontrado en el promotor del gen de la insulina (Tanizawa et al., 1992). Existen tres isoformas del gen generadas por procesamiento alternativo de sus exones y por el uso de los diferentes promotores, dos de estas isoformas son hepáticas y una específica de páncreas, enterocitos y sistema nervioso central (Figura 13). Las isoformas hepáticas, presentan bien el exón 1b o bien el exón 1b y 1c, mientras que la isoforma pancreática presenta el exón 1a, de forma que las tres isoformas difieren en los quince primeros aminoácidos (Stoffel et al., 1992a).

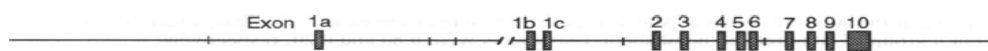


Figura 13. Estructura del gen de la glucoquinasa. El exón 1a es específico del páncreas mientras que los exones 1b y 1c lo son del hígado. Esto se debe al uso de promotores específicos de tejido.

b) Características de la proteína GCK

El producto del gen de la glucoquinasa es una proteína de 465 aminoácidos y 50 Kda de peso molecular. Es una enzima que pertenece a la familia de la hexoquinasas y cataliza el primer paso de la glucólisis, la

fosforilación de la glucosa a glucosa 6-fosfato (Figura 14). Al igual que el resto de hexoquinas, tiene capacidad para fosforilar otras hexosas, como la manosa y la fructosa, pero a diferencia de ellas, presenta una baja afinidad por la glucosa, lo que le permite funcionar como sensor de los niveles de glucosa en estos tejidos (Cardenas et al., 1998).

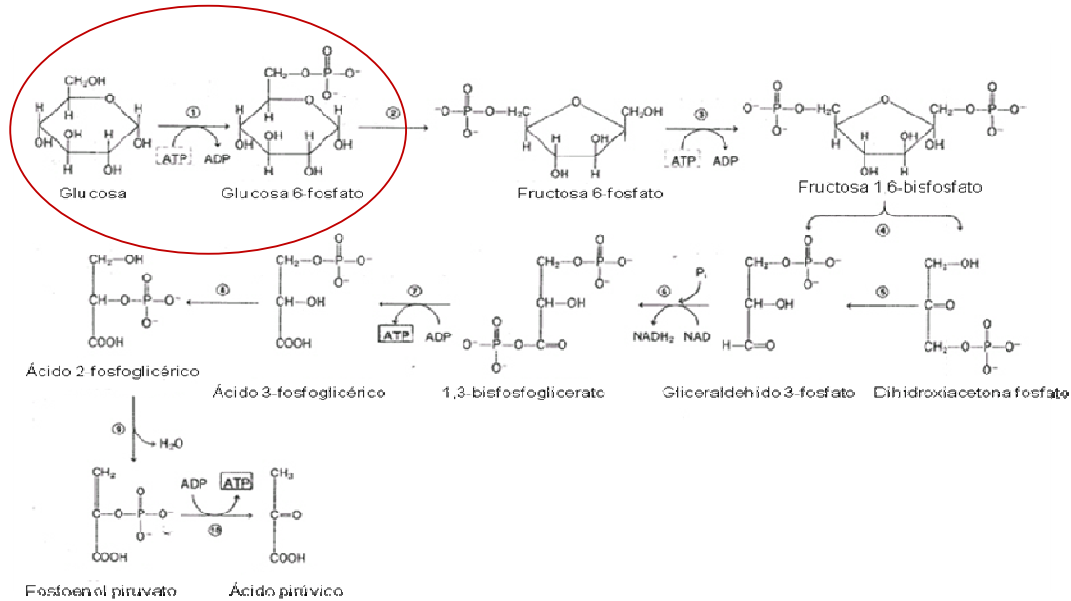


Figura 14. La glucucoquinasa cataliza la primera etapa de la glucólisis, el paso de glucosa a glucosa 6-fosfato, en hígado y páncreas.

La glucucoquinasa presenta dos dominios, un dominio pequeño y un dominio grande, separados por una hendidura que es la región donde se une la glucosa y el ATP (Figura 15). La glucosa se une a E256 y E290 del dominio grande, T168 y K169 del dominio pequeño y N204 y D205 de la región conectora (Estalella et al., 2008).

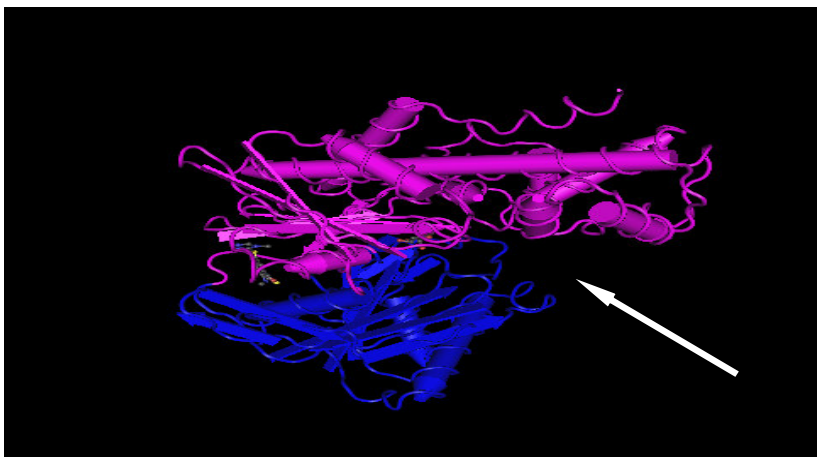


Figura 15. Estructura de la glucoquinasa. El dominio grande está representado en morado y el dominio pequeño en azul. La hendidura entre ambos dominios es el sitio de unión a la glucosa (señalado con la flecha).

La glucoquinasa actúa como monómero y presenta dos conformaciones, una super-abierta, inactiva, y una cerrada, activa. Existe también un estado intermedio o abierto que aún no ha logrado ser cristalizado. La conformación super-abierta es termodinámicamente más estable y mayoritaria cuando las concentraciones de glucosa son bajas. Cuando los niveles de glucosa aumentan, ésta interacciona con el residuo D205 y se produce un cambio conformacional hasta un estado cerrado, donde también se une el ATP produciéndose la fosforilación de la glucosa. Cuando la reacción termina, la enzima pasa a un estado abierto donde se libera la glucosa 6-fosfato y ADP (Kamata et al., 2004).

La glucoquinasa, al contrario que el resto de hexoquinasas, tiene una K_m (constante de Michaelis) muy elevada (10mM), lo que puede traducirse como una baja afinidad por su sustrato, de manera que necesita altas concentraciones de glucosa para activarse. Presenta dos ciclos catalíticos dependiendo de la concentración de glucosa en el medio, de forma que cuando la concentración de glucosa es baja, la glucoquinasa permanece mayoritariamente en su conformación inactiva y su afinidad por la glucosa es baja, por lo que el paso de la conformación inactiva a la activa es un proceso lento. Cuando la concentración de glucosa es alta, la glucoquinasa tiene una mayor afinidad por la glucosa y el paso de la conformación inactiva a la activa

es muy rápido. Es por ello que la glucoquinasa actúa como sensor de los niveles de glucosa en el hígado y en el páncreas (Iynedjian, 2009).

c) Regulación de GCK

En el hígado la glucoquinasa está sujeta a regulación a través de la proteína reguladora de la glucoquinasa (GCKR). El hígado es el órgano central que mantiene el nivel de glucosa en sangre, de manera que dependiendo de las concentraciones de glucosa, la glucoquinasa puede encontrarse activada o inhibida. La GCKR se une de forma no covalente a la glucoquinasa en los residuos 51 y 52 y del 141 al 144, que se encuentran alejados de los sitios de unión a la glucosa y ATP, y se une preferencialmente a la conformación superabierta de la glucoquinasa (Mahalingam et al., 1999). Cuando los niveles de glucosa son bajos, la GCKR translocaría la glucoquinasa al núcleo de la célula, impidiendo su contacto con el resto de enzimas de la glucólisis que se encuentran en el citoplasma. Cuando los niveles de glucosa aumentan, el complejo GCKR-GCK se disocia y queda al descubierto una secuencia de exportación nuclear presente en la glucoquinasa, de forma que la glucoquinasa sale al citoplasma (Figura 16).

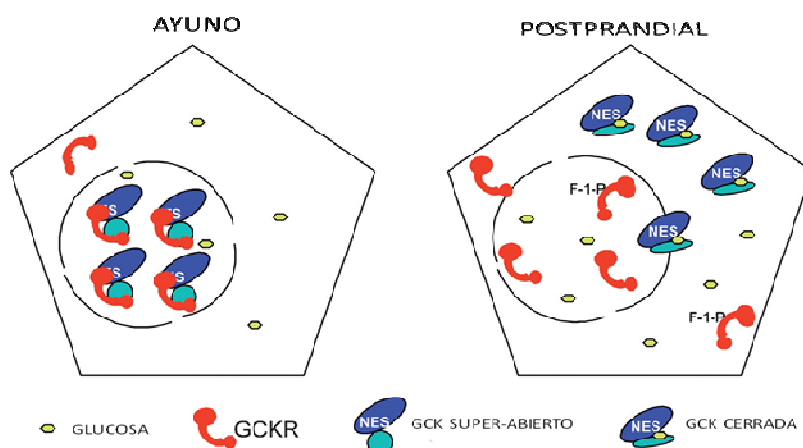


Figura 16. Regulación de la glucoquinasa por GCKR. Cuando la concentración de glucosa es baja, el complejo GCKR-GCK se localiza en el núcleo. Cuando la concentración aumenta, la glucoquinasa se libera de su unión con GCKR y sale al citoplasma a través de una secuencia de exportación nuclear. Ya en el citoplasma adquiere la conformación cerrada activa y comienza a fosforilar a la glucosa que llega (Iynedjian, 2009).

La GCKR es una proteína cuya función depende de dos ligandos, la fructosa 6-fosfato y la fructosa 1-fosfato. La fructosa 6-fosfato propicia que la unión de GCKR y la glucoquinasa sea más fuerte, inhibiendo por tanto la glucólisis (Baltrusch et al., 2006). Por el contrario, la fructosa 1-fosfato debilita la interacción de la GCKR con la glucoquinasa facilitando la activación de la misma. Los niveles de fructosa 1-fosfato se elevan tras la ingestión de fructosa y su absorción por el intestino (Iynedjian, 2009).

Sin embargo, en las células β del páncreas no existe regulación de la glucoquinasa por parte de GCKR ya que su nivel de expresión en este tejido es prácticamente nulo. Algunas proteínas, como la fosfofructoquinasa-2 (PFK2) o la óxido nítrico sintasa (NOS), parecen unirse a la glucoquinasa y regular su actividad, aunque se necesitarían más estudios para comprobar estas uniones y ver su efecto fisiológico sobre estas células (Arden et al., 2004; Massa et al., 2004). Un estudio reciente ha encontrado que la glucoquinasa puede poliubiquitinarse en varios residuos de lisina y que esto también podría modificar la cinética enzimática de la glucoquinasa (Bjorkhaug et al., 2007); sin embargo, al igual que en los casos anteriores, se requieren más estudios para comprobar su efecto en el funcionamiento de las células β .

d) Papel de la GCK en el metabolismo de la glucosa

La glucoquinasa es una enzima clave para la regulación del metabolismo de la glucosa. En las células β , cuando los niveles de glucosa aumentan tras la ingestión de alimentos, la glucosa atraviesa el transportador GLUT2 y rápidamente es fosforilada por la glucoquinasa a glucosa 6-fosfato continuando con el proceso glucolítico, activándose de esta manera los procesos que dan lugar a la exocitosis de los gránulos de insulina. Estudios en ratones a los que se les inhibe el promotor neuroendocrino muestran una diabetes severa y mueren a los pocos días del nacimiento debido a que la estimulación de la secreción de insulina por la glucosa está completamente bloqueada (Terauchi et al., 1995)..

A diferencia del páncreas, donde la glucoquinasa se expresa de forma constitutiva, en el hígado la expresión de la glucoquinasa es inducida por la insulina. El mecanismo por el cual la insulina activa la expresión de la

glucoquinasa en el hígado todavía no está bien estudiado, aunque se piensa que algunos factores de transcripción, como HNF4 α o el factor inducible en hipoxia 1 α (HIF-1) pueden estar implicados en la activación de la transcripción, ya que hay sitios de unión a ambos factores en el promotor hepático de la glucoquinasa (Roth et al., 2004). Por otra parte, la glucoquinasa hepática interviene en la formación de glucógeno, ya que la glucosa 6-fosfato es un activador alostérico de la glucógeno sintetasa. Ratones que presentan una deficiencia en la glucoquinasa del hígado sobreviven hasta la edad adulta, pero muestran cierto grado de resistencia a insulina (hiperglucemia e hiperinsulinemia). Tras la ingestión de alimentos, cuando el nivel de hiperglucemia es más alto, se observa que estos ratones fallan a la hora de aumentar los niveles de glucógeno y presentan alteraciones en el metabolismo de la glucosa (Postic et al., 1999). Sin embargo, en muchos de estos ratones también puede producirse inactivación de la glucoquinasa pancreática, por lo que en realidad lo que se observa es un efecto de la pérdida global de la función de la glucoquinasa en ambos tejidos.

En otros tejidos como el sistema nervioso central, se ha observado expresión de la glucoquinasa. En el hipotálamo ventromedial, la glucoquinasa se expresa en neuronas que expresan la hormona proopiomelanocorticoide (POMC) y neuropéptido Y (NPY) que desempeñan un papel clave en la regulación de la ingesta de comida y gasto energético (Dunn-Meynell et al., 2002).

e) GCK y su implicación en la diabetes MODY

En 1992 se descubrió la primera mutación en el gen de la glucoquinasa asociada con la diabetes MODY. Se trataba de la mutación sin sentido E279X encontrada en una familia con criterios MODY. Solo un miembro de esta familia, que también tenía diabetes, no poseía esta mutación, por lo que se encontró una familia con dos tipos de diabetes (Vionnet et al., 1992).

Hasta el momento se han encontrado 238 mutaciones diferentes que se distribuyen a lo largo de todo el gen, incluyendo las regiones promotoras. Muchas de estas mutaciones se han caracterizado funcionalmente mediante el estudio de los distintos parámetros cinéticos así como en modelos predictivos.

Algunas mutaciones no tienen efecto o reducen su actividad a la mitad con respecto a la forma *wild-type*, como la mutación K420E (Estalella et al., 2008). También se han descrito otras mutaciones totalmente inactivantes de la enzima, como la mutación C233 que se localiza en la lámina β 10 que se encuentra en la zona hidrofóbica que separa el dominio grande del dominio pequeño y, por tanto, que contiene el centro activo de la enzima. El cambio del aminoácido cisteína por arginina, que posee una cadena lateral más grande puede provocar una reorganización de la zona que conlleva una desestabilización del centro activo (Estalella et al., 2008). Por el contrario, otras mutaciones provocan un aumento en la actividad de la glucoquinasa causando hipoglucemia debido a una mayor secreción de insulina, como las mutaciones T65I y W99R (Gloyn, 2003). El estudio de este tipo de mutaciones así como un mejor conocimiento de la estructura de la glucoquinasa puede ayudar a la búsqueda de nuevas terapias para el tratamiento de la DM2.

2.5.3 DIABETES MODY 3

La diabetes MODY3 es el segundo tipo de diabetes MODY más frecuente en la población española ya que entre un 10-20% de los casos de MODY corresponden a esta variante. El gen causante de la diabetes MODY3 es el factor de transcripción HNF1 α . Vaxillaire y colaboradores realizaron un estudio de asociación en 12 familias francesas y localizaron una zona de susceptibilidad con MODY en el brazo largo del cromosoma 12. Posteriormente Yamagata y colaboradores identificaron a HNF1 α como el gen causante de esta variante (Yamagata et al., 1996b).

La diabetes MODY3, al igual que la diabetes MODY1, es una forma severa de diabetes. Las diabetes MODY3 y MODY1 presentan las mismas características y complicaciones, ya que los genes HNF1 α y HNF4 α están fuertemente relacionados, aunque en el caso de la MODY3 el metabolismo lipídico no está alterado. Los pacientes que presentan mutaciones en el gen HNF1 α tienen un nivel menor de reabsorción renal de la glucosa y, por tanto, mayor glucosuria. El tratamiento, al igual que en la MODY1, son hipoglucemiantes orales y en muchos casos, hasta el 40%, insulina.

a) Características del gen HNF1A

El factor hepático nuclear 1 α (HNF1 α) (OMIM*142410) se localiza en el brazo largo del cromosoma 12, en la posición 12q24.2, y se extiende a lo largo de 23 Kb. El gen contiene 10 exones y dos sitios de poliadenilación en el extremo 3'. El uso diferencial de estos sitios de poliadenilación así como el procesamiento alternativo de los exones 6 y 7 dan lugar a la presencia de tres isoformas, A, B y C (Figura 17) (Bach et al., 1990). La isoforma A es la isoforma completa que contiene los 10 exones y se expresa fundamentalmente en hígado, riñón, intestino y en el páncreas fetal. La isoforma B, que es mayoritaria en los islotes pancreáticos, procede del uso alternativo de la otra señal de poliadenilación presente al final del exón 7 y contiene los exones del 1 al 7. La isoforma C, tiene el mismo origen que la isoforma B, aunque sufre un procesamiento alternativo del exón 6, de manera que carece de los exones 7, 8, 9 y 10. Tanto la isoforma B como la C tienen una capacidad activadora de la transcripción más potente que la isoforma A, lo cual puede ser debido a una mayor estabilidad o una mayor eficiencia en la síntesis y transporte al núcleo (Bach y Yaniv, 1993).

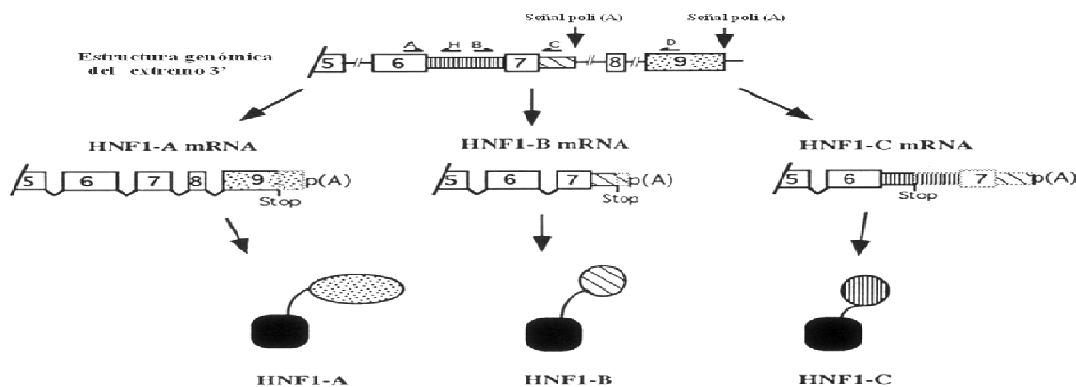


Figura 17. El uso diferencial de los sitios de poliadenilación que se encuentran en el gen HNF1 α , así como el procesamiento alternativo del exón 6 explicaría la formación de las 3 isoformas de HNF1 α .

b) Características de la proteína HNF1 α

La proteína HNF1 α es miembro de la familia de factores de transcripción homeobox o con dominios homeodominios. La isoforma completa consta de

631 aminoácidos con un peso molecular de 67 KDa y presenta 3 dominios fundamentales, un dominio de dimerización, un dominio de unión a DNA y un dominio de transactivación (Figura 18). En la región N-terminal se localizan los dominios de dimerización y de unión a DNA, mientras que en el extremo C-terminal se halla el dominio de transactivación.

El dominio de dimerización comprende los aminoácidos 1 al 32 y está formado por 4 hélices α compactadas. HNF1 α puede formar homómeros u heterodímeros con HNF1 β . También se une al cofactor DCoH, que es una proteína pequeña de 11 KDa que sirve para estabilizar el dímero (Mendel y Crabtree, 1991).

El dominio de unión al DNA consta de dos homeodominios, POU_H y POU_S, que se encuentran muy conservados a lo largo de la evolución y comprende de los aminoácidos 150 al 278. El dominio POU_H está formado por 3 hélices α separadas por un giro que forman un dominio muy compacto. El segundo homeodominio, POU_S, consta de 5 hélices α , que comprenden los aminoácidos 91 a 180 y, además de su función de unión al DNA, también resulta crítico para la estabilidad de la proteína (Chi et al., 2002). El dominio de unión se une al surco mayor de la cadena de DNA y reconoce la secuencia palindrómica g/aGTTAATNATTAACc/. Dentro de este dominio, entre los aminoácidos 197 al 205, hay una zona rica en aminoácidos ácidos que contiene una señal de localización nuclear (Bach et al., 1990).

En la región C-terminal se localiza el dominio de activación de la transcripción, que es una zona rica en serinas y treoninas. La proteína HNF1 α presenta una homología del 94% con la proteína en ratón, siendo la región de activación de la transcripción la zona más divergente entre ambas especies.



Figura 18. Esquema de la proteína HNF1 α . En la parte N-terminal se localizan los dominios de dimerización y de unión a DNA, el cual a su vez está formado por dos dominios POU. En la parte C-terminal se halla el dominio de transactivación.

c) Funciones de HNF1 α

La expresión de HNF1 α en el páncreas comienza a partir del día E10.5 del desarrollo embrionario del ratón, antes de la aparición de las células productoras de insulina y glucagón, y se mantiene a lo largo de toda la vida. Este factor no es imprescindible para la diferenciación de las células del páncreas, pero sí para el mantenimiento de la expresión de algunos genes fundamentales para su funcionamiento en la fase final del desarrollo de los islotes pancreáticos (Boj et al., 2001). Estudios en ratones en los que se inactiva de forma homocigota el gen HNF1 α , muestran que éstos presentan un tamaño de páncreas más pequeño y una desorganización celular del mismo, además de defectos en la secreción de insulina en respuesta a la glucosa (Pontoglio et al., 1998). Un estudio reciente relaciona la ausencia de HNF1 α y un menor tamaño del páncreas con una disminución de la señalización a través de diana de mamífero de la rapamicina (mTOR). Esta proteína forma parte de dos complejos, TORC1 y TORC2, que forman parte de la ruta de señalización de la fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3K) y AKT1, que están implicados en el crecimiento celular y apoptosis, entre otros. La falta de HNF1 α inhibe el complejo mTORC1, lo que tiene como consecuencia una disminución en el tamaño celular así como un incremento de la apoptosis celular (Farrelly et al., 2009).

HNF1 α regula la expresión de genes necesarios para la función de las células β , como el de transportador GLUT2, la piruvato quinasa (PK-L) y la insulina, entre otros, considerándose como el regulador principal de la función de estas células. La expresión de algunos factores, como HNF3 γ y HNF4 γ así como de HNF4 α , depende de HNF1 α . Esta red de factores de transcripción es muy compleja ya que implica una serie de activadores e inhibidores, como el receptor SHP, algunos de los cuales regulan los genes diana de forma indirecta a través de factores intermedios (Figura 19) (Boj et al., 2001).

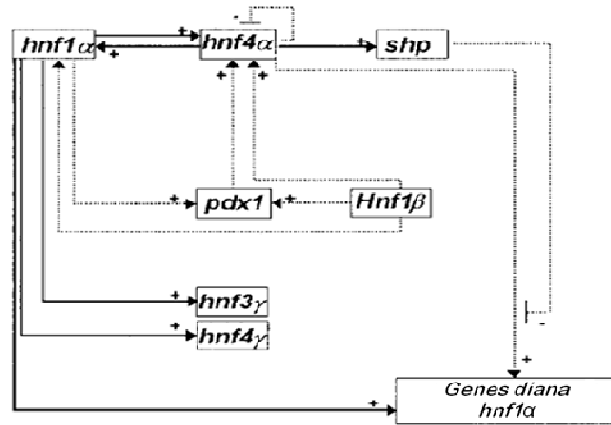


Figura 19. Esquema de la red de factores de transcripción que controla el funcionamiento de las células β , en el cual HNF1A desempeña un papel clave.

HNF1 α es regulado por HNF4 α , existiendo entre ambos una regulación recíproca, de manera que la transcripción de uno de ellos depende del otro. En el promotor del gen HNF1 α se ha encontrado un elemento DR1 al cual se une HNF4 α y, a su vez, dentro del promotor P2 de HNF4 α se encuentran zonas de unión para HNF1 α . Esta doble regulación permite la creación de un circuito dentro de la célula β , que permite la regulación de la secreción de insulina en respuesta a glucosa así como la secreción basal de esta hormona para mantener unos niveles fisiológicos de glucosa. Cuando uno de los dos genes está mutado se produce la descompensación de este circuito y, por tanto, una disfunción de las células productoras de insulina, que tiene como consecuencia la aparición de la diabetes (Ferrer, 2002).

Los ratones *knockout* para HNF1 α sobreviven después del nacimiento pero presentan una serie de anomalías, no solo en el páncreas, sino también en hígado y riñón, que provocan el acortamiento de la vida de estos ratones (Pontoglio et al., 1998). A nivel hepático presentan hepatomegalia y análisis bioquímicos revelan la presencia de hipercolesterolemia y de hiperfenilalaninemia, ya que HNF1 α interviene en la remodelación de la cromatina en la zona promotora del gen de la fenilalanina hidrolasa (PAH), una enzima clave para la degradación de la fenilalanina. Por lo tanto, la ausencia de HNF1 α en estos ratones provoca una inactividad completa de esta enzima, que tiene como consecuencia la acumulación de fenilalanina (Pontoglio et al., 1998). Los niveles de expresión de otras proteínas controladas por HNF1 α ,

como el α -fibrinógeno o la albúmina, solo se encuentran parcialmente reducidos por lo que tiene que haber otros mecanismos compensatorios que permitan su expresión en ausencia de HNF1 α (Pontoglio, 2000).

Algunos pacientes con diabetes MODY3 presentan defectos en la reabsorción renal de glucosa. Ratones con deficiencia en HNF1 α exhiben una drástica reducción en la reabsorción de glucosa y arginina en los túbulos renales y análisis de *Northern blot* comprobaron que la expresión del transportador SGLT2, que se encarga de la reabsorción de la glucosa al inicio de los túbulos renales proximales, está afectada en ratones deficientes en HNF1 α (Pontoglio et al., 2000).

d) HNF1A y su implicación en diabetes MODY

Hasta la fecha se han descrito unas 200 mutaciones del gen HNF1A, muchas de las cuales se asocian con diabetes MODY. La mayoría de las mutaciones son *missense*, aunque también hay mutaciones que afectan al procesamiento de los diferentes exones del gen así como deleciones e inserciones. Los primeros en describir mutaciones en el gen HNF1A relacionadas con diabetes MODY fueron Yamagata y colaboradores en el año 1996 (Yamagata et al., 1996b). Las mutaciones se distribuyen a lo largo de todo el gen y las que se encuentran entre los exones 8 y 10 están relacionadas con la aparición de la diabetes a una edad más tardía que las mutaciones que se encuentran en los 7 primeros exones, lo cual puede explicarse por la diferente función y distribución de las tres isoformas (Figura 20) (Harries et al., 2006).

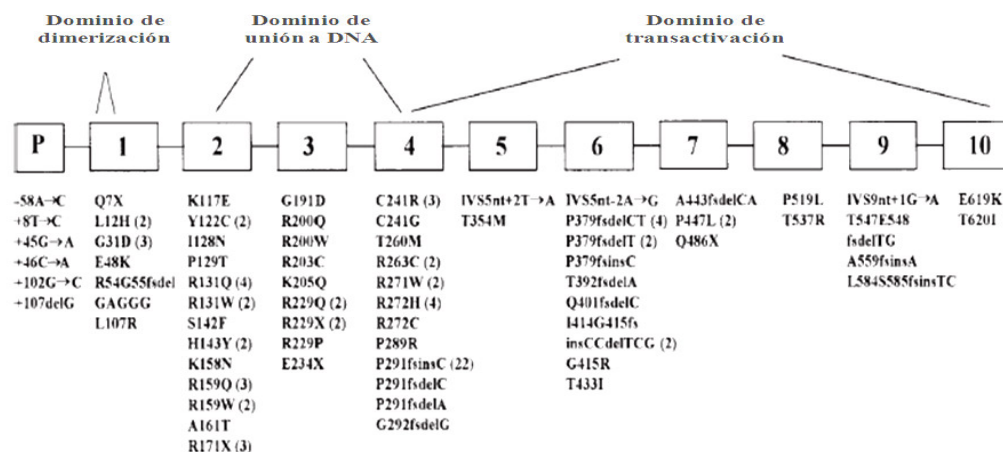


Figura 20. Representación de la distribución de las mutaciones a lo largo del gen HNF1α (Yamagata et al., 2003).

Una de las mutaciones más frecuentes es la inserción de una citosina en el tracto de poliC en el exón 4 (P291fsinsC) que genera un cambio en la fase de lectura y la aparición de un codón de stop prematuro, que da lugar a una proteína de 340 aminoácidos que pierde el dominio de transactivación conservando los dominios de dimerización y unión al DNA. De hecho, esta proteína truncada es capaz de formar heterodímeros con la proteína nativa HNF1α así como con HNF1β impidiendo su unión al DNA, por lo que la mutación P291fsinsC actúa como dominante negativa impidiendo la función de la proteína del alelo normal (Yamagata et al., 1998).

El gen HNF1A es muy polimorfo y se han descrito varios polimorfismos frecuentes dentro de la población, como el cambio de isoleucina por leucina en el codón 27 (I27L), el cambio de alanina por valina en la posición 98 (A98V) y el cambio de serina por asparragina en el codón 487 (S487N). Son muchos los estudios realizados sobre la implicación de estos polimorfismos en la función de las células β y su asociación a diabetes tipo 2, algunos de los cuales con resultados contradictorios, lo que puede deberse a las diferencias entre las distintas poblaciones utilizadas. De esta manera, se ha observado que los homocigotos para el fenotipo leucina del polimorfismos I27L presentan una mayor resistencia a insulina que los heterocigotos o los homocigotos para la isoleucina, además de una disminución en la secreción de insulina de hasta el 30% a los 30 minutos de la sobrecarga oral de glucosa (Urhammer et al.,

1997b). El polimorfismo A98V se ha asociado a una reducción del péptido C y de la secreción de insulina a los 30 minutos de la sobrecarga oral de glucosa. Los individuos heterocigotos presentan una reducción de hasta el 18% y el único individuo homocigoto para valina presentaba una reducción de hasta el 23% (Urhammer et al., 1997a). Otro estudio muestra una modesta contribución al incremento del riesgo de padecer DM2 (Winckler et al., 2005). Con respecto al polimorfismo S487N, no se han encontrado evidencias de que este polimorfismo modifique la actividad de HNF1 α , aunque se ha encontrado de forma más frecuente en la población de DM2 de origen autosómico dominante de aparición tardía (Giuffrida et al., 2009). Por tanto, HNF1 α no solo está implicado en la diabetes MODY3, sino que algunos de sus polimorfismos también contribuyen al incremento del riesgo de DM2, debido a las funciones, tanto en el páncreas como en el hígado, que ejerce esta proteína.

2.5.4 DIABETES MODY 4

La diabetes MODY 4 es una forma rara de diabetes y sólo hay un estudio familiar completo de esta variante de MODY (Stoffers et al., 1997). El gen responsable de este tipo de diabetes MODY es el gen IPF-1 ya que se encontró una mutación en el mismo dentro de una familia con diabetes tipo 2 de aparición temprana (Stoffers et al., 1997).

Este tipo de diabetes MODY se caracteriza por una hiperglucemia media o severa y, en muchos casos, va acompañada de defectos estructurales del páncreas e incluso agenesia del mismo. El tratamiento utilizado es el control de la dieta e hipoglucemiantes orales. Se desconoce si este tipo de diabetes da lugar a las complicaciones típicas de esta enfermedad.

a) Características del gen PDX-1

El gen PDX-1(OMIM*600733), que codifica la proteína IPF-1 o factor promotor de la insulina, se localiza en el brazo largo del cromosoma 13, concretamente en la posición 13q12.1. El gen presenta dos exones y la zona promotora se localiza en la posición entre -2175 y -1960 (Schwitzgebel et al., 2003).

b) Características de la proteína IPF-1

La proteína IPF-1 pertenece a la familia homeobox y consta de 283 aminoácidos y un peso molecular de 30.6 KDa. Presenta un dominio de transactivación localizado en la parte N-terminal de la proteína, un homeodominio de unión al DNA muy conservado y una parte C-terminal también muy conservada a lo largo de la evolución. Actúa como heterodímero uniéndose a otros factores como PBX, TCF3 o NeuroD1 (Schwitzgebel et al., 2003).

c) Funciones de IPF-1

IPF-1 resulta fundamental para el desarrollo del páncreas, ya que los ratones “*knockout*” para este gen presentan agenesis pancreática y mueren a los pocos días del nacimiento debido a una hiperglucemia perinatal severa (Jonsson et al., 1994). En el ratón IPF-1 comienza su expresión en las células del endodermo dorsal que ya están comprometidas a un linaje pancreático, siendo fundamental tanto para la diferenciación del páncreas como para el mantenimiento de la función de las células β . Ya en el adulto IPF-1 es necesario para la activación de la expresión de genes, como la insulina, GLUT2 y la glucoquinasa (Ahlgren et al., 1998; Watada et al., 1996). IPF-1, junto con otros genes como MafA, están siendo muy estudiados por su implicación en la patogénesis y susceptibilidad a diabetes mellitus así como para la utilización de dianas terapéuticas en esta enfermedad (Docherty et al., 2005).

d) IPF-1 y su implicación en la diabetes MODY

Son pocas las mutaciones encontradas en IPF-1 relacionadas con diabetes MODY. La primera mutación encontrada es la delección de una citosina en el exón 1 (Pro63fsdelC) localizada en un tracto de poliC, que codifica una región rica en prolina necesaria para los dominios de transactivación (Stoffers et al., 1997). Esta mutación se comporta como dominante negativa ya que se une a la proteína del alelo normal impidiendo su unión al DNA y, por tanto, la activación de los genes regulados por IPF-1 (Stoffers et al., 1998).

2.5.5 DIABETES MODY 5

La diabetes MODY 5 es otra forma rara de diabetes que, además de la hiperglucemia, va acompañada de una disfunción renal severa no diabética debida a un fallo en el desarrollo del riñón. En el año 1997 Horikawa y colaboradores descubrieron una mutación en el gen HNF1B dentro de una familia con diabetes de aparición temprana y con nefropatía no específica, que asociaron con esta enfermedad (Horikawa et al., 1997).

Los pacientes con diabetes MODY 5 suelen presentar riñones de tamaño más pequeño, quistes renales, túbulos primitivos e hiperuricemia. Además, también son frecuentes anomalías en el tracto genital como aplasia vaginal y útero bicornal en mujeres, y quistes epididimales y agenesia de los conductos deferentes en hombres. Por ello, la diabetes MODY 5 también se llama síndrome del quiste renal y diabetes (Horikawa et al., 1997). El tratamiento en este caso, además de la dieta y de los hipoglucemiantes orales, puede llegar a ser necesario un trasplante renal.

a) Características del gen HNF1B

El gen HNF1B (OMIM*189907) se localiza en el brazo largo del cromosoma 17, concretamente en la posición 17q2. Contiene 9 exones y presenta sitios alternativos de poliadenilación de manera que se generan tres isoformas, A, B y C (Bach et al., 1990).

b) Características de la proteína HNF1 β

La proteína codificada por el gen HNF1B presenta 557 aminoácidos y un peso molecular de 61Kda. Pertenece a la familia homeobox, aunque su dominio de unión al DNA presenta una estructura que difiere del resto de la familia. Contiene tres dominios, un dominio de dimerización en el extremo N-terminal, un dominio de unión a DNA en la región central y un dominio de transactivación en el extremo C-terminal. Puede actuar como homodímero o como heterodímero formando un complejo con HNF1 α . Además, reconoce la misma secuencia dentro del DNA que HNF1 α (Bach et al., 1990)

c) Funciones de HNF1 β

En el ratón, HNF1 β comienza a expresarse en las células del endodermo visceral extraembrionario, cuando empieza a formarse el primordio pancreático y antes de la expresión de HNF1 α . HNF1 β interviene en la formación del páncreas así como del riñón y del hígado (Coffinier et al., 1999). Junto con HNF1 α , controla la expresión de numerosos factores de transcripción que intervienen en la diferenciación del páncreas y regula la expresión de genes que intervienen en el desarrollo del mismo, como el factor HNF4 α entre otros (Thomas et al., 2001). Sin embargo, su papel es mucho más relevante en el riñón, ya que a los ratones a los que se les inactiva HNF1 β presentan defectos en el desarrollo del mismo. El factor HNF1 β regula la expresión de los genes PKD2, PKHD1 y Umod que están implicados en la enfermedad quística (Gresh et al., 2004). Mutaciones en el gen HNF1 β provocan la sobreexpresión de SOCS-3, lo que inhibe la tubulogénesis dependiente de HGF, así como la expresión de los genes EGF, IGF1 y la angiotensina 2, que también están implicados en la tubulogénesis y nefrogénesis (Ma et al., 2007). Por lo tanto, pese a las similitudes en la estructura entre HNF1 α y HNF1 β , tienen diferentes funciones durante la organogénesis de algunos órganos, como páncreas y riñón. Además, HNF1 β presenta expresión en pulmón mientras que HNF1 α no tiene expresión en este órgano. Por el contrario, la presencia de HNF1 α en hígado es mayor que la de HNF1 β (Pontoglio, 2000).

d) HNF1B y su implicación en la diabetes MODY

Las mutaciones en HNF1B se distribuyen a lo largo de todo el gen (Figura 21). La primera mutación encontrada en este gen asociada a MODY 5 fue en 1997 en dos hermanos japoneses que presentaban diabetes y una nefropatía no diabética asociada (Horikawa et al., 1997). La mutación era un cambio de citosina por timina que daba lugar a la aparición de un codón de stop en la posición 177 de la proteína, que generaba una proteína sin función.

La mayoría de las mutaciones encontradas en este gen van acompañadas de defectos en los riñones, como la aparición de quistes, además de la hiperglucemia característica de la diabetes.



Figura 21. Representación de la proteína HNF1β y de las mutaciones descritas hasta el momento. Estas se distribuyen a lo largo de todo el gen y el dominio POU_S es el que contiene el mayor número de mutaciones por lo que podría tratarse de un punto caliente de mutaciones.

2.5.6 DIABETES MODY 6

La diabetes MODY 6 es también una forma muy poco frecuente y sólo hay un estudio familiar (Malecki et al., 1999). Fajans y colaboradores en 2001 fueron los primeros en acuñar el término MODY 6 a la diabetes debida a mutaciones en el gen NEUROD1 (Fajans et al., 2001).

Las características clínicas de la diabetes MODY 6 son muy similares a las de MODY3, aunque la edad de aparición de MODY 6 es más tardía, de la tercera a sexta década de vida (Malecki et al., 1999).

a) Características del gen NEUROD1

El gen NeuroD1 (factor de diferenciación de la neurogenina o BETA2) se localiza en el cromosoma 2, en la posición 2q32. Contiene 2 exones, aunque el primero de ellos es no codificante (Tamimi et al., 1996).

b) Características de la proteína NEUROD1/BETA2

La proteína NEUROD1 pertenece a la familia de factores de transcripción de hélice-bucle-hélice (bHLH). Está formada por 356 aminoácidos y tiene un peso molecular de 40 KDa. En la región central de la proteína se encuentra el dominio de unión a DNA, que es un motivo básico de hélice-bucle-hélice. En el extremo C-terminal se encuentra el dominio de transactivación (Figura 22). NeuroD1 actúa como heterodímero junto con el

factor E47 para unirse a elemento E presente en el promotor de la insulina y activar de esta forma su transcripción (Naya et al., 1995).

c) Funciones de NEUROD1/BETA2

El factor NeuroD1 interviene en la formación de las células endocrinas del páncreas y su expresión es paralela a la de otros factores que también intervienen en la diferenciación de este tipo celular, como Ngn3 (Neurogenina 3), que regula su expresión, e insulinoma 1 (Naya et al., 1997). Los ratones knockout para NEUROD1 presentan un hiperglucemia severa y cetonuria y mueren a los pocos días del nacimiento. A nivel celular presentan una desorganización de las células endocrinas, lo que sugiere que NeuroD1 resulta esencial para la morfogénesis del páncreas (Naya et al., 1997). Este factor también interviene en la formación de ciertas neuronas terminales del epitelio nasal y de la retina, y se encuentra expresión de esta proteína en el cerebelo, hipocampo y glándula pituitaria (Chu et al., 2001).

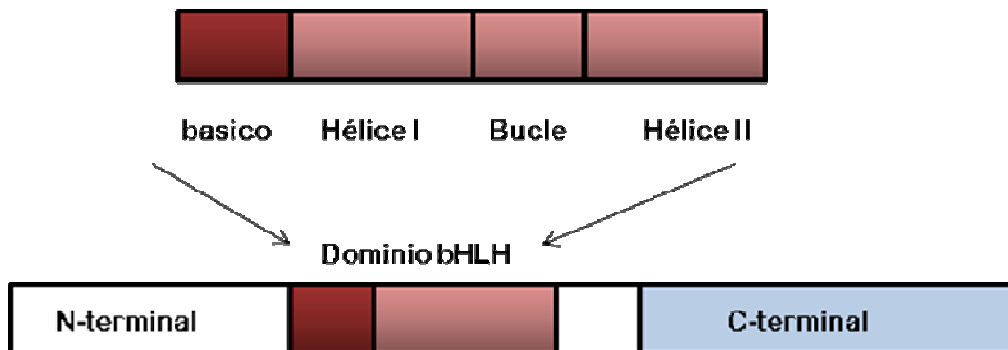


Figura 22. Esquema de la proteína NeuroD1 así como del dominio bHLH, característico de la familia y que sirve para unirse al DNA. En la parte C-terminal se encuentra el dominio de transactivación.

d) NEUROD1 y su implicación en la diabetes MODY

Hasta el momento se han descrito dos mutaciones en este gen relacionadas con diabetes MODY. La primera de ella es la transversión de guanina por timina, que da lugar al cambio de arginina por leucina en la

posición 111 de la proteína. El aminoácido R111 se encuentra en la porción básica proximal del dominio HLH y se encuentra muy conservado a lo largo de la evolución. Esta mutación se encontró en 6 pacientes de la misma familia, cuatro de ellos tenían diabetes de inicio temprano (entre 30 y 59 años) y dos presentaban intolerancia a la glucosa. El estudio funcional de esta mutación revelaba que el aminoácido leucina impedía su unión al promotor de la insulina (Malecki et al., 1999). La otra mutación asociada a diabetes MODY es la inserción de una citosina en un tracto de poliC en el codón 206 de la proteína que cambia el marco de fase de lectura y genera un codón de stop prematuro de forma que la proteína mutante pierde casi toda la parte C-terminal de la proteína y, por tanto, el dominio de transactivación. Esta mutación se encontró en otra familia en la que siete portadores de la mutación eran diabéticos y dos no presentaban diabetes, de manera que presenta una baja penetrancia. El estudio funcional de la mutación también reveló la incapacidad para activar la transcripción del gen de la insulina por ausencia del dominio de transactivación (Malecki et al., 1999).

También se han descrito varios polimorfismos dentro de este gen que se asocian a DM1 y DM2, aunque esta asociación no se encuentra en todas las poblaciones, de manera que son necesarios más estudios sobre la función y regulación de este gen para comprobar su implicación en los mecanismos que subyacen en la patogénesis de la diabetes tipo 1 y 2 (Hansen et al., 2000; Iwata et al., 1999).

2. OBJETIVOS

Durante los últimos años, la prevalencia de la diabetes se ha incrementado de forma exponencial en todos los países debido en gran medida a los cambios en los hábitos alimenticios, obesidad y estilo de vida. Se estima que en el año 2025 la cifra de diabéticos se duplique, lo que supone un grave problema de salud mundial. La diabetes es un síndrome crónico cuya principal característica es el incremento de la concentración de glucosa en sangre o hiperglucemia, debido bien a la falta de insulina o bien a que la insulina presente no puede ejercer correctamente su acción. Existen dos tipos principales de diabetes. La diabetes tipo 1 que suele aparecer durante la infancia, la adolescencia y la juventud que se debe a un fenómeno autoinmune donde las células productoras de insulina en el páncreas son destruidas por el propio organismo. La diabetes tipo 2 es consecuencia de una resistencia a la insulina normalmente asociada a un defecto de la célula β y que suele aparecer a edades más avanzadas, aunque cada vez aparece en etapas más tempranas. Frecuentemente se acompaña de obesidad. La diabetes MODY es un tipo de diabetes cuyas principales características son una edad de aparición temprana, antes de los 25 años, un patrón de herencia autosómico dominante, con fuertes antecedentes familiares y ausencia de obesidad. Existen 6 tipos de diabetes MODY, dependiendo del gen mutado. Las más comunes por orden de frecuencia son MODY2, MODY 3 y MODY 1, donde los genes mutados son la glucoquinasa, HNF1 α y HNF4 α , respectivamente, todos ellos relacionados con la función de las células β . La frecuencia del resto de tipos de diabetes MODY es muy baja.

Con nuestro trabajo nos propusimos estudiar variantes alélicas en genes implicados en el desarrollo de la diabetes y sus complicaciones, y compararlas con una población control de manera que pudiésemos determinar variantes asociadas con la enfermedad. Por otro lado, hemos estudiado los tres genes más importantes implicados en el desarrollo de la diabetes MODY en pacientes y familias que cumplen los criterios de diagnóstico para este tipo de diabetes, buscando la presencia de nuevas mutaciones no descritas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

1. PACIENTES

1.1 PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO DE CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES ALÉLICAS ASOCIADAS AL DESARROLLO DE DIABETES

Para el estudio de caracterización de variantes alélicas asociadas al desarrollo de diabetes se han recogido muestras de sangre periférica de 172 pacientes con diagnóstico clínico de diabetes mellitus tipo 1 y 169 pacientes con diagnóstico clínico de diabetes mellitus tipo 2, procedentes únicamente del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario de Salamanca. Así mismo, se recogieron 189 muestras de sangre periférica obtenida de individuos sanos con un rango amplio de edad, como grupo control. Todas las muestras fueron obtenidas, previo consentimiento, siguiendo las normas legales para Estudios Clínicos en España y las del Comité de Ética del Hospital Universitario de Salamanca.

1.2 PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO GENETICO DE DIABETES MODY

Para el estudio genético de diabetes MODY, se han estudiado 55 pacientes con diagnóstico clínico de sospecha de diabetes MODY, remitidos entre 2008 y 2010 de diferentes hospitales de Castilla y León, a la Unidad de Medicina Molecular del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca para su caracterización genética.

2. EXTRACCIÓN DE DNA

El DNA genómico de alto peso molecular se extrajo a partir de sangre periférica de todas las muestras.

Tras centrifugar la muestra de sangre periférica se aisló la interfase de células leucocitarias, que se resuspendieron en tampón Fornace (0.25M

sacarosa; 50mM Tris-HCl pH 7.5; 25 mM KCl; 5mM MgCl₂); EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0.5M pH 8, que es un quelante de iones divalentes que posibilita la inactivación de las nucleasas; proteinasa K 20 mg/L, que degrada las proteínas; y SDS (dodecil sulfato sódico) al 10%, que rompe las membranas celulares. Esta mezcla se incubó a 55° C durante unas 16 horas, tras lo cual se purificó el DNA tratándolo con una mezcla de fenol tamponado y CIAA (cloroformo:alcohol isoamílico 24:1) y centrifugando posteriormente para aislar las fases. Con este tratamiento el DNA queda en la fase acuosa, que se limpió de otros residuos mezclándola, de nuevo, con CIAA y centrifugando para separar las dos fases, una que contiene el DNA y otra que contiene los detritos celulares. Tras este paso se añadió etanol absoluto frío a la fase acuosa, precipitando el DNA, que se recuperó, se lavó con etanol al 70% y, finalmente, se resuspendió en agua desionizada. La muestra de DNA se almacenó en tubos eppendorff a -20° C, con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del DNA como la posible contaminación.

La concentración y el grado de contenido proteico de DNA se calcula tras medir su absorbancia a 260 y 280 nm, respectivamente, en un espectrofotómetro automático de DNA/RNA (GeneQuant, Pharmacia), siguiendo la fórmula:

$$\mu\text{g de DNA / ml} = (\text{DO}_{260}) \times (\text{factor de dilución}) \times 50$$

(Nota: 50 es un factor de corrección introducido, ya que la unidad de densidad óptica con una luz incidente de 260 nm es un valor de absorbancia que tiene 50 μg de DNA / ml).

El cociente $\text{DO}_{260} / \text{DO}_{280}$ se utiliza para determinar el grado de contaminación proteica, considerándose como valores adecuados un cociente entre 1.65 y 2. Valores inferiores a los señalados indican contaminación por proteínas o solventes orgánicos; en estos casos, se procedió a realizar una nueva purificación del DNA. Valores superiores indican un exceso de RNA, que se elimina tratando la solución de DNA con RNAsa y purificando de nuevo, según el método descrito anteriormente.

3. DISCRIMINACION ALÉLICA MEDIANTE PCR CON SONDAS TAQMAN

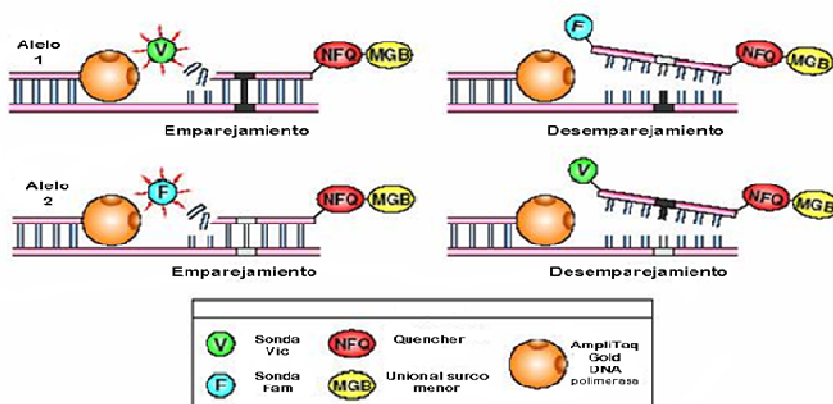
En la PCR con sondas Taqman, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de DNA sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores para llevar a cabo la PCR con sondas Taqman incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR con sondas Taqman pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos.

Para los estudios de asociación de variantes alélicas asociadas a susceptibilidad al desarrollo de diabetes hemos empleado sondas específicas marcadas con fluorocromos. Estas sondas de hibridación específica son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. En todos nuestros ensayos de discriminación alélica mediante PCR con sondas Taqman los fluorocromos empleados fueron VIC y FAM.

Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación del DNA diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la

sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor están, ahora, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (Figura 24).

a)



b)

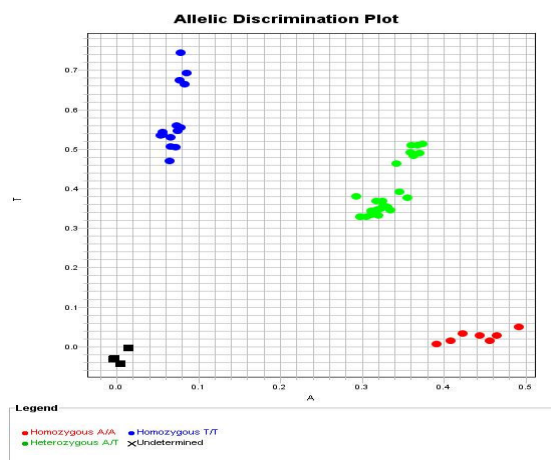


Figura 24. a) Mecanismo de la PCR con sondas Taqman. b) Representación de los resultados del genotipado en la que cada nube de puntos respresenta cada uno de los genotipos, los dos tipos de homocigotos y los heterocigotos en el centro.

El incremento de DNA en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de estas sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales. Nuestro estudio se realizó en el termociclador de *StepOne Plus™ Real Time PCR* de Applied Biosystems, que dispone de varios canales de lectura y

permite detectar la emisión de distintos fluorocromos a la vez. De esa manera, se pueden usar varias sondas marcadas con distintos fluorocromos, para identificar los diferentes alelos descritos en cada uno de los genes estudiados, que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de las sondas utilizadas en los genes de estudio. Los nucleótidos marcados con las diferentes sondas se encuentran marcados en negrita.

GEN	SONDA VIC	SONDA FAM
IL1B	TACCTTGGGTGCTGTTCTCTGCCT CGG GAGCTC TCTGTCAATTGCAGGAGC	TACCTTGGGTGCTGTTCTCTGCCT CAG GAGCTCTCTG TCAATTGCAGGAGC
IL4	TTAGCTTCTCCTGATAAACTAATT GCCT CACATT GTCACTGCAAATCGACA	TTAGCTTCTCCTGATAAACTAATT GTCT CACATTGTCA CTGCAAATCGACA
IL6	TCTTG CG ATGCTAAA	TCTTG CC ATGCTAAA
IL8	CATACA ATT GATAATTCA	CATACA TTT GATAATTCA
CD40	GTCCTGCCGCCTGGTCTCACCTCG CC ATGGTTC GTCTGCCTCTGCAGTGCG	GTCCTGCCGCCTGGTCTCACCTCG CT ATGGTTCGTCT GCCTCTGCAGTGCG
CTLA4	GCACAAGGCTCAGCTGAACCTGGCT ACC AGGAC CTGGCCCTGCACTCTCCT	GCACAAGGCTCAGCTGAACCTGGCT GCC AGGACCTG GCCCTGCACTCTCCT
TCF7L2	TAGAGAGCTAAGCACTTTT AGATACT ATATAATT TAATTGCCGTATGAGG	TAGAGAGCTAAGCACTTTT AGATA TATTATATAATTTAAT TGCCGTATGAGG
EDN1	TTCATGATCCCAAGCTGAAAGGCAAG CCCT CCA GAGAGCGTTATGTGACCC	TTCATGATCCCAAGCTGAAAGGCAAT CCCT CCAGAGA GCGTTATGTGACCC
PPARG	AACTCTGGGAGATTCTCCTATTGAC CC AGAAAG CGATTCTTCACTGATAC	AACTCTGGGAGATTCTCCTATTGAC GC AGAAAGCGAT TCCTTCACTGATAC
TNFα	GGCCCAGAAGACCCCCCTCGGAAT CAG AGCAG GGAGGATGGGGAGTGTGAG	GGCCCAGAAGACCCCCCTCGGAAT CGG AGCAGGGAG GATGGGGAGTGTGAG
VEGF	GCCAGCTGTAGGCCAGACCCTGGCA AGAT CTG GGTGGATAATCAGACTGAC	GCCAGCTGTAGGCCAGACCCTGGCA CGAT CTGGGTG GATAATCAGACTGAC
eNOS298	CCCCAGATGATCCCCCAGAACTC	CCCCAGATGAGCCCCCAGAACTC
IL4-R	CTGTGTCTGCAGAGCCACACGTGT AGT CCCTG	CTGTGTCTGCAGAGCCACACGTGT G TCCCTGAGAAC

	AGAACAACGGAGGCGCGGG	AACGGAGGCGCGGG
HNFI1A	GAGAACCTCAGCCCTGAGGAGGCGGCCACCA GAAAGCCGTGGTGGAGACC	GAGAACCTCAGCCCTGAGGAGGCGGTCCACCAGAAA GCCGTGGTGGAGACC

4. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA DIABETES MODY MEDIANTE EL ESTUDIO DE LOS GENES GCK, HNF1A Y HNF4A

4.1 PCR

Las muestras de DNA para el estudio genético de la diabetes MODY, fueron amplificadas por la técnica de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Se amplificaron todos lo exones codificantes de los genes GCK, HNF1A y HNF4A así como las fronteras intrón-exón y exón-intrón mediante cebadores específicos que anillan en la zona intrónica. Los exones 5 y 6 del gen GCK se amplificaron juntos debido a la poca distancia que hay entre ellos (Tabla 2).

Tabla 2. Cebadores utilizados para la amplificación de cada uno de los exones de los genes GCK, HNF1A y HNF4A, así como las temperaturas de anillamiento de cada de ellos.

GEN	CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENTIDO	Tº anillamiento
GCK 1A	TCCAATTCAGAAGCCTACTG	TCAGATTCTGAGGCTCAAAC	54
GCK1B	AGCAGGCAGGAGCATCTCTG	GCTGCTCTCCAGAGCAAAG	55
GCK1C	GCCCAACTGCTACTTGGAAC	AGGAGGTGAGAAGCCTGGAG	55
GCK2	TGCAGATGCCTGGTGACAGC	CACAGCTGCTTCTGGATGAG	55
GCK3	TAATATCCGGCTCAGTCACC	CTGAGATCCTGCATGCCTTG	56
GCK4	TAGCTTGGCTTGAGGCCGTG	TGAAGGCAGAGTTCCTCTGG	57

GCK5-6	TCTGAGCCTGTTTCCTCAGC	GGCCCTTGAAGCCTGTTGTA	60
GCK7	CCAGACAAAGCAGAGACAGG	TGCTTTTCCCCAGAGTTGTT	55
GCK8	TGGCTCATTAACGAGGGAAA	CTGAGACCAAGTCTGCAGTG	55
GCK9	CCCTCCCTGGAGAACGAGAG	AATCTTGGAGCTTGGGAACC	55
GCK10	GAGTCTTCTCGACCCCCTTG	CACCGAAAACTGAGGGAAG	55
HNF1A1	GGCAGGCAAACGCAACCCACG	GAAGGGGGGCTCGTTAGGAG	60
HNF1A2	CATGCACAGTCCCCACCCTCA	CTTCCAGCCCCCACCTATGA	55
HNF1A3	AGGGCAAGGTCAGGGGAATGGA	CCAGCCCAGACCAAACCAGCAC	60
HNF1A4	CAGAACCTCCCCTTCATGCC	AGGTGACTGCTGTCAATGGGAC	60
HNF1A5	GGCAGACAGGCAGATGGCCTA	GCCTCCCTAGGGACTGCTCCA	60
HNF1A6	CTGGAGCAGTCCCTAGGGAGGC	TTGCCCCATGAGCCTCCCACC	55
HNF1A7	TCTTGGGCAGGGGTGGGATAT	CTGCAATGCCTGCCAGGCACC	55
HNF1A8	GAGGCCTGGGACTAGGGCTGT	GCTCTGTCACAGGCCAAGGGAG	55
HNF1A9	CCTGTGACAGAGCCCCTCACC	AGAGTGACGGACACGAACAGA	55
HNF1A10	GTACCCCTAGGGACAGGCAGG	ACCCCCAAGCAGGCAGTACA	55
HNF4A1	GGGCACTGGGAGGAGGCAGT	GCCTGTAGGACCAACCTACC	55
HNF4A1B	TCTGGTGTGCACGACTGCAC	CTGGAGCTGCAGCCTCATAC	55
HNF4A2	ATGGCTCCCTTAGATGCCTGA	CCACTCAGGGAGAAGACAGACC	55
HNF4A3	CCTAGTTCTGTCCTAAGAGGA	GCCATAAAGTGTGGCTACAG	55
HNF4A4	ACCCCTACTCCATCCCTGTT	CCCTCCCGTCAGCTGCTCCA	55
HNF4A5	GTGCAGGGGACAGAGAATGCG	AATCAAGCCAGTCCACGGCTA	55
HNF4A6	GCCCAGCGTCACTGAGTTGGCT	TTGCCTGGGTGAGTGCCATG	55

HNF4A7	GCACCAGCTATCTTGCCAAC	TAGGAGAGGTCTGGCAGAGCGT	55
HNF4A8	CTCCTTGTGTGACACAAGTC	CTCACTGTGTGAGGCCTG	52
HNF4A9	TGGTTGATTGGCCACGCCTG	TCCTGGTTCTACCTTCTAG	52
HNF4A10	TCATTACTCCACAAAGGCT	GACCACGTGATCACCAGGTG	55

La amplificación de la PCR se realizó con *MasterMix de Promega™* (25 unidades de Taq polimerasa, 200 µM de cada uno de los dNTPs y 1,5 mM de MgCl₂). La concentración de cada uno de los cebadores fue de 10 µM y la cantidad empleada de DNA genómico fue de 100-200 µg.

El programa utilizado fue el siguiente:

94°C.....	5'	
94°C.....	30"	} X 40 ciclos
T°anillamiento exón.....	30"	
72°C.....	30"	
72°C	7'	

Los termocicladores empleados para la amplificación de los diferentes exones fueron los modelos *9700*, *2720* y *Verity* de Applied Biosystems y *2400* de Perkin Elmer.

Una alícuota de los fragmentos amplificados mediante PCR se separó por su tamaño mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 2% (Pronadisa) preparados con tampón TBE (Tris 0.044 M, ácido bórico 0.044 M, EDTA 1.0 mM pH=8.3). Para monitorizar la migración del DNA en el gel se utilizaron dos colorantes que se incluyeron en el tampón de carga añadido a la muestra: el xilenocianol, que migra aproximadamente con los fragmentos de 5 Kb en un gel de agarosa al 0.8%, y el azul de bromofenol, que migra aproximadamente con los fragmentos de 0.5 Kb. Nos servimos de un marcador de peso molecular comercial que corría en paralelo a las muestras para inferir

el tamaño de los fragmentos: el DNA del fago Φ X-174 cortado con la endonucleasa *HaeIII* (Promega) fue el marcador utilizado rutinariamente.

Tras la electroforesis, los fragmentos amplificados se visualizaron en el gel de agarosa utilizando *SYBRSafe®* (1/10000) (Invitrogen) que actúa intercalándose entre las bases nitrogenadas del DNA y emitiendo fluorescencia al ser expuesto a la luz UV (530nm). Los resultados obtenidos fueron almacenados mediante un sistema de fotografía digital (Kodak DC290) acoplado a un software informático de tratamiento de imágenes (Kodak Digital Science 1D) (Figura 25).

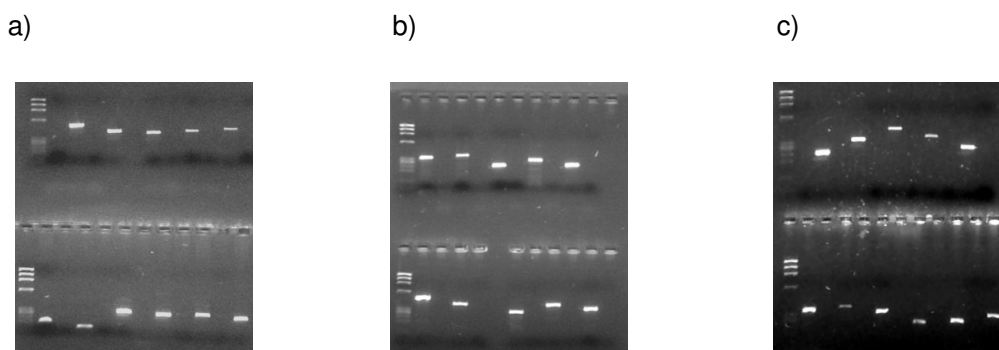


Figura 25. A) Electroforesis de los exones amplificados del gen GCK. B) Electroforesis de los exones amplificados del gen HNF1A. C) Electroforesis de los exones amplificados del gen HNF4A.

4.2 ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS POR PCR MEDIANTE CSGE (ELECTROFORESIS EN GEL SENSIBLE A CONFORMACIÓN)

Los fragmentos de DNA amplificados fueron sometidos a análisis por CSGE siguiendo la técnica descrita por Orita, con algunas modificaciones (Orita et al., 1989). El paso inicial del análisis por CSGE consiste en desnaturalizar el producto de PCR a 95° C y volver a renaturalizarlo, para permitir la formación de heterodúplex (apareamiento entre cadenas que difieren en su secuencia) en el caso de individuos heterocigotos (Figura 26). Heterodúplex y homodúplex migran de manera diferencial en geles de acrilamida, los cuales fueron teñidos con nitrato de plata.

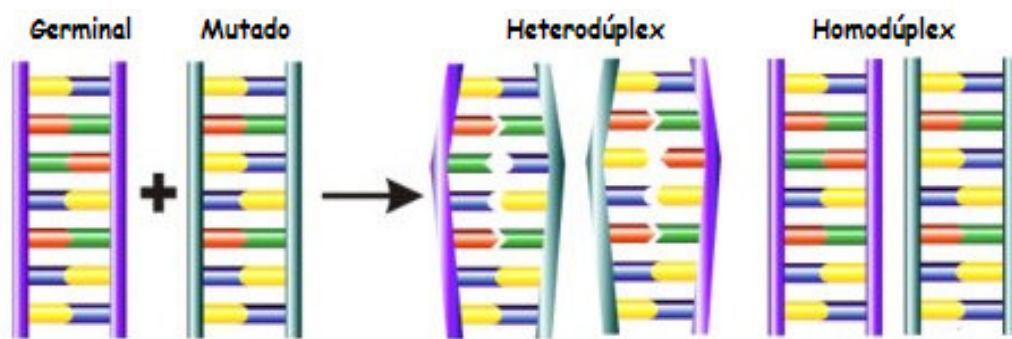


Figura 26. Formación de heterodúplex tras la desnaturalización y posterior renaturalización del producto de PCR en un individuo heterocigoto.

Los gels para electroforesis fueron hechos con *SequaGel® MD 2X* (National Diagnostics), que es un polímero de acrilamida modificado derivado del vinilo. Se utilizaron las siguientes cantidades para preparar cada gel: agua desionizada 7.705 mL, formamida 99% 5.98 mL, etilenglicol 99% 4.025 mL, TBE 10X 2.415 mL, SeaquaGel® MD 2X 20.125 mL, TEMED (N, N, N, N' Tetrametilendiamina) 36.8 μ L, APS (persulfato de amonio) 25% 138 μ L para un volumen final de 40.25 mL. La electroforesis se llevó a cabo a 180 voltios durante aproximadamente 21 horas (el tiempo varió dependiendo del tamaño del fragmento de PCR a analizar). En paralelo se realizó, en todos los casos, la electroforesis de un fragmento de PCR sin mutación.

Para la tinción de plata se utilizó el reactivo comercial *DNA Silver Staining*, reactivo de (G.E. healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos de PCR que presentaban un patrón de migración diferente al control fueron secuenciados (Figura 27).

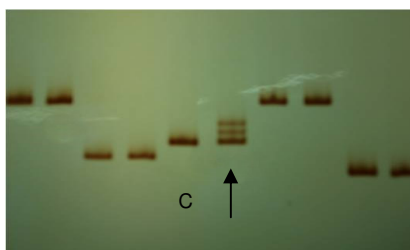


Figura 27. Muestra de un gel de acrilamida teñido con nitrato de plata para la detección de mutaciones en los genes GCK, HNF1A y HNF4A. C: control negativo. ↑: Muestra con mutación.

Esta técnica fue utilizada rutinariamente para el rastreo de mutaciones en los genes GCK, HNF1A y HNF4A.

4.3 SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA

La secuenciación automática se llevó a cabo en un secuenciador ABI 377 (Applied Biosystems) en el Servicio Central de Secuenciación de la Universidad de Salamanca).

Para la preparación de las muestras se purificó el fragmento de PCR mediante el reactivo comercial *PureLink™ PCR Purification Kit* (Invitrogen). Este reactivo se basa en la capacidad del DNA de unirse selectivamente a una membrana de sílice en presencia de sales caotrópicas. En primer lugar, el producto de PCR o el fragmento de agarosa que lo contiene se disuelven en una solución tampón con isotiocianato de guanidina. El DNA queda retenido en la superficie de sílice de la matriz mientras el resto de los compuestos son eluidos a través de la columna al centrifugar. Después el DNA se lava con un tampón que contiene etanol y finalmente se eluye con una solución tampón de baja concentración salina.

Se preparó una muestra con el cebador sentido y otra con el cebador antisentido en una concentración de 3 pmol de cada uno en un volumen de 2 µl. El DNA se preparó a una concentración de 40-60 ng para un volumen final de 8 µl.

5. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA MUTACIÓN p.K205N DEL GEN HNF1A

5.1 EXTRACCIÓN DE RNA Y SÍNTESIS DE cDNA DEL GEN HNF1A

Para la caracterización de la mutación p.K205N encontrada en el gen HNF1A, se procedió inicialmente a la obtención del cDNA completo del gen

HNF1A, para lo que se utilizó la línea celular HepG2 (human hepatocellular liver carcinoma) que expresa este gen. El RNA de estas células se extrajo siguiendo una modificación del método de Chomczynski y Sacchi (Chomczynski y Sacchi, 1987) empleando el reactivo Trizol (Invitrogen). Para ello, se utilizó 1 mL de Trizol por cada $5\text{-}10 \times 10^6$ células. Después se realizó una extracción selectiva del RNA mediante separación de fases tras la adición de 200 μL de cloroformo por cada mL de Trizol. El RNA obtenido en la fase acuosa se precipitó con un volumen de isopropanol, se centrifugó a 12000g durante 10 min a 4°C y, finalmente, se resuspendió en agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato 0.1%, Sigma), calentando todo a 65°C para favorecer la disolución.

La concentración del RNA se determinó en un espectrofotómetro GeneQuant (Pharmacia), midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm. (coeficiente de extinción RNA ($C = 25 \text{ (cm} \cdot \mu\text{g}/\mu\text{L})^{-1}$) y la presencia de contaminantes (proteínas, residuos de fenol) se comprobó midiendo el ratio A_{260}/A_{220} (rango de valores normales 2.0-2.2) y A_{260}/A_{280} (valores normales 1.6-1.8). La integridad de la muestra de RNA se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (w/v) en TBE.

La síntesis de cDNA se realizó mediante el sistema *ImProm-IITM Reverse Transcription System* (Promega) siguiendo las especificaciones del fabricante. Inicialmente, se desnaturalizó mediante calor una mezcla de 1 μg de RNA total y 0,5 μg del oligo (dT)₁₅ a 70°C durante 5 minutos. El cDNA se sintetizó en presencia de 1U de la transcriptasa inversa *ImProm-IITM*, buffer *ImProm-IITM* 1X, 4 mM Cl_2Mg , una mezcla de dNTP (desoxinucleótidos tri-fosfato) 0.5 mM, 20 u. del inhibidor de ribonucleasas *Recombinant RNasin[®]* y agua libre de RNasas. La reacción se sometió durante 5 minutos a 25°C y, posteriormente, se incubó a 42°C durante 1 hora para permitir la síntesis del cDNA mediante la transcriptasa inversa. Finalmente, la enzima fue inactivada desnaturalizando la mezcla durante 15 minutos a 70°C.

Para comprobar que la síntesis de cDNA se había realizado con éxito, se amplificó mediante PCR parte del cDNA correspondiente al gen de la GAPDH,

el cual se expresa constitutivamente en todos los tejidos. Los cebadores utilizados fueron GAPDH_{Sentido} (5' CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA 3') y GAPDH_{Antisentido} (5' TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC 3') y cuyo programa de amplificación es 94°C 30s, 55°C 30s y 72°C 30s en 30 ciclos.

La RT-PCR se llevó a cabo utilizando *GoTaq Hot Start Polymerase®* de Promega (5u/μl de *Go Taq Polymerase®*, 2mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP, 10 μM de cada cebador y 50μg de cDNA). Esta enzima aumenta el rendimiento y especificidad de la PCR, y además de presenta actividad 5'-3' exonucleasa que permite la corrección de errores durante el proceso de síntesis. Los cebadores utilizados para amplificar el cDNA de HNF1A contienen los sitios de restricción de las endonucleasas *EcoRI* y *XbaI* que permiten su posterior clonación dentro del vector de expresión pCEFL (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar el cDNA de HNF1A. El cebador sentido contiene el sitio de restricción para la endonucleasa *EcoRI* mientras que el cebador antisentido contiene un sitio de restricción para la endonucleasa *XbaI*

CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENTIDO
5' <u>CCGGAATTCC</u> GAGCCATGGTTTCTAACTGA GC 3'	5' <u>CTAGTCTAGAC</u> CGTGGTTACTGGGAGGAAGA GGC 3'

El programa de termociclador empleado fue el siguiente:

95°C.....	5'	
95°C.....	30"	} X5
55°C.....	30"	
72°C.....	1'	
95°C.....	30"	} X5
56°C.....	30"	
72°C.....	1'	
95°C.....	30"	} X5
57°C.....	30"	
72°C.....	1'	

95°C.....	30''	}	X5
58°C	30''		
72°C.....	1'		
95°C.....	30''	}	X5
59°C	30''		
72°C.....	1'		
95°C.....	30''	}	X25
60°C	30''		
72°C.....	1'		
72°C.....	7'		

Se amplificaron varios fragmentos de un tamaño aproximado al correspondiente con el del cDNA de HNF1A, que fueron aislados y purificados con el kit *Agarose Gelextract minikit* de 5Prime que permite la purificación del DNA en geles de agarosa utilizando un sistema de columnas de sílice. El resultado de la purificación se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%

5.2. AMPLIFICACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN GLUT2 MEDIANTE PCR

La región -1296 a +312 del gen del transportador de glucosa GLUT2, correspondiente a la zona promotora de este gen, se amplificó a partir de DNA genómico. En los extremos de los cebadores se añadió la secuencia de restricción de la endonucleasa *KpnI* (Fermentas), lo que permitirá su posterior clonación en el vector de expresión pGL3-Basic (Tabla 4). La PCR se realizó utilizando el sistema *GoTaq Hot Start Polymerase®* de Promega descrito anteriormente (5u/μl de *Go Taq Polymerase®*, 2mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP, 10 μM de cada cebador y 50μg de cDNA).

Tabla 4. Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de la región promotora de del gen GLUT2. La secuencia de restricción de la enzima *KpnI* se encuentra subrayada.

PROMOTOR	CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENTIDO
GLUT 2	<u>CGGGGTACCT</u> GGAACCGCTCCTGA	<u>GTACGGTACCT</u> CGCAGCTCTGCCTA

El programa de termociclador empleado fue el siguiente:

95°C..... 5'	
95°C..... 30''	} X40
57°C..... 30''	
72°C..... 1'	
72°C..... 7'	

La amplificación del producto de PCR se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y la banda obtenida del tamaño esperado se purificaron con el kit *Agarose Gelextract minikit* de 5Prime, siguiendo las instrucciones del fabricante. El resultado de la purificación se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

5.3 CLONACIÓN EN VECTORES DE EXPRESIÓN

5.3.1 CLONACIÓN EN EL VECTOR pGEM-T® Easy

Los fragmentos obtenidos en la RT-PCR de HNF1A y en la PCR del promotor de GLUT2, fueron clonados en el vector pGEM-T®Easy (Promega), constituido por una cadena doble de DNA lineal que permite ligar en sus extremos productos de PCR sin necesidad de que éstos sean manipulados previamente. Además, este vector ofrece la posibilidad de selección por color de los eventos de ligación, ya que el sitio de clonación interrumpe el operón *Lac*, y de selección de transformación, ya que contiene un gen de resistencia a ampicilina (*Amp^r*) (Figura 28). Para la reacción de ligación se emplearon 50 ng

del vector, 1U de ligasa T4 (Fermentas), Buffer de reacción 1X (30 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, 10% polietilenglicol, pH= 7,8), 60-100 µg de producto de PCR y hasta 10 µl de H₂O, y se dejó durante dos horas a temperatura ambiente.

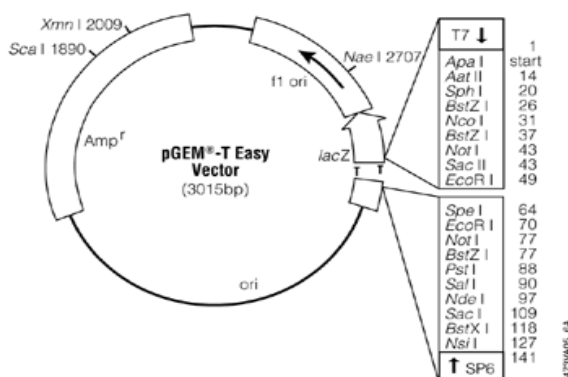


Figura 28. Representación del vector de clonación pGEM-T® Easy.

5.3.2 PREPARACIÓN DE CELULAS COMPETENTES

Las reacciones de ligación fueron utilizadas para la transformación de la cepa bacteriana competente DH5α derivada de *E.coli*. Para ello, se sembró una colonia de esta cepa bacteriana en medio LB, y se dejó crecer a 37°C en agitación hasta alcanzar una DO₆₀₀ aproximada de 0.6. El cultivo se centrifugó a 1200g durante 10 min a 4°C. El botón celular obtenido se resuspendió en 100mL de CaCl₂ 100mM a 4°C y, tras una nueva centrifugación, las bacterias se resuspendieron en 10mL de CaCl₂ 100mM.

5.3.3 TRANSFORMACIÓN DE CELULAS COMPETENTES

Se incubaron 5 µL de la reacción de ligación con 30 µL del cultivo de bacterias competentes durante una hora en hielo. Pasado este tiempo, la mezcla se sometió a un choque térmico de 42°C durante 2 min tras el que se añadieron 300µL de LB, para proseguir con una incubación de la mezcla a 37°C

durante 30 min. La bacteria transformada se sembró, junto con 50 μ L de IPTG (20 mg/mL) (inductor de la transcripción del operón *Lac*) y 50 μ L del sustrato X-Gal (20 mg/mL), en medio sólido preparado con 20 mg/mL de ampicilina para llevar a cabo la selección de transformación. Las placas de cultivo se incubaron en una estufa a 37°C durante 12-16 horas.

5.3.4 EXTRACCION DE DNA PLASMIDICO DE COLONIAS TRANSFORMADAS

Las colonias que no adquirieron color azul debido a que la clonación del inserto interrumpía la secuencia codificante del operón *Lac* presente en el vector pGEM®-T easy (Promega), se sembraron en 5 mL de LB suplementado con ampicilina. Los cultivos se dejaron crecer a 37°C en agitación constante durante 6-16 h. y se centrifugaron durante 10 min a 2000 rpm. Para el aislamiento de los plásmidos se utilizó el kit comercial *PlasmidPrep* (GeneDan) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Los plásmidos se precipitaron con isopropanol y posteriormente fueron lavados con etanol al 70%. Después se dejaron secar y se resuspendieron en 20 μ L de agua bidestilada.

La concentración del DNA plasmídico se determinó mediante espectrofotometría con un espectrofotómetro GeneQuant (Pharmacia), utilizando una longitud de onda de 260 nm.

5.3.5 CLONACIÓN EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pCEFL

Los fragmentos aislados de la RT-PCR del gen HNF1A y clonados en el vector pGEM®-T Easy, fueron insertados en el vector de expresión pCEFL (Figura 29). Previamente, se digirieron tanto el vector pCEFL como las construcciones en pGEM-T®Easy con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *XbaI*, para lo que se emplearon 1U de cada una de las endonucleasas de restricción, buffer Tango 1X (33mM Tris-acetato, 10mM Mg-acetato, 66mM K-acetato, 0,1mg/ml BSA) y 2 μ g de cada DNA y H₂O hasta un volumen final de 10 μ L. La reacción se incubó durante 3 horas a 37°C.

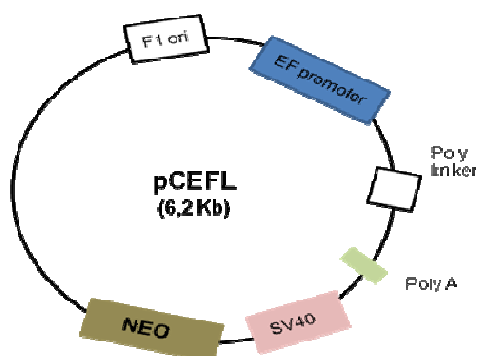


Figura 29. Representación del vector de expresión pCEFL

Los productos resultantes de la digestión fueron separados en un gel de agarosa al 1% y recortados del mismo para su aislamiento y purificación utilizando el sistema descrito previamente. Finalmente, se comprobó el resultado de la purificación con una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

La reacción de ligación entre los cDNAs de HNF1A y el vector de expresión pCEFL se realizó empleando 50 ng de vector, 1U de Ligasa T4 (Fermentas), buffer de reacción 1X (30 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, 10% polietilenglicol, pH= 7,8), 0,5mM de ATP y 60-100 ng de cada uno de los cDNAs. La reacción se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, esta reacción fue transformada siguiendo descritos anteriormente.

Para comprobar la eficiencia de la ligación, los plásmidos obtenidos se digirieron con las enzimas *EcoRI* y *XbaI*. Los plásmidos que contenían inserto fueron secuenciados para su comprobación (Figura 30).

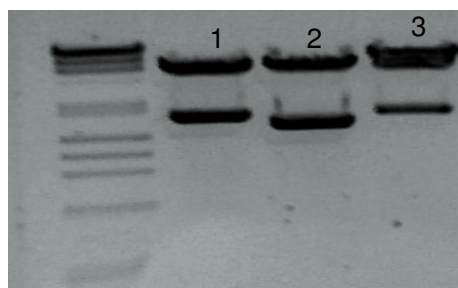


Figura 30. Digestión con las enzimas *EcoRI* y *XbaI* para la comprobación de la eficiencia de ligación de los fragmentos aislados de la RT-PCR en el vector pCEFL. 1: pCEFL-HNF1A *wild type*. 2: pCEFL-HNF1A $\Delta 2$. 3: pCEFL- HNF1A insIVS8.

5.3.6 CLONACIÓN EN EL VECTOR pGL3-Basic

El promotor del gen GLUT2, insertado en el vector pGEM-T®Easy, fue clonado posteriormente en el vector de expresión pGL3-Basic (Promega), que contiene el gen reportero de la luciferasa, de manera que este promotor controlara la expresión del gen reportero (Figura 31). Para ello se utilizó el sitio de restricción *KpnI* que nos permitió clonar el promotor de GLUT2 en fase con el gen de la luciferasa.

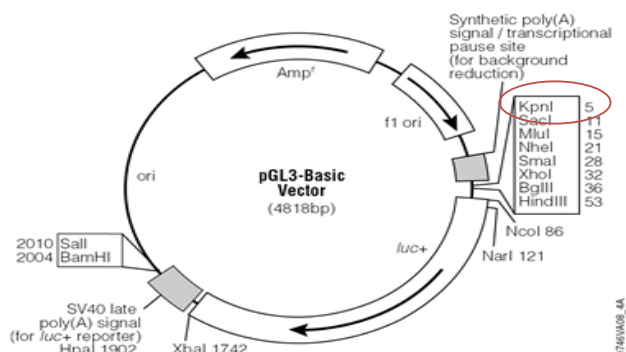


Figura 31. Representación del vector pGL3-Basic (Promega), que contiene el gen reportero de la luciferasa. La enzima *KpnI* utilizada para la clonación en este vector se encuentra marcada en rojo.

La reacción de digestión se realizó con 1U de endonucleasa de restricción, buffer específico para KpnI 1X (1mM de Tris-HCL pH 7,5, 1mM de $MgCl_2$, 0,002% Triton X-100 y 0,01mg/mL de BSA), 2 μ g DNA y H_2O hasta un volumen final de 10 μ l. La reacción se incubó durante 3 horas a 37°C. El producto resultante de la digestión se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y la banda de interés fue recortada y purificada del gel. El resultado de la purificación se comprobó también mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Para la ligación del promotor de GLUT2 en el vector pGL3-Basic se utilizó 50 ng de vector, 1U de ligasa T4, buffer de reacción 1X, 0,5mM de ATP, y de 60-100 ng de DNA del promotor. La reacción se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La transformación y selección de colonias se produjo siguiendo el protocolo anteriormente descrito. La comprobación de la eficiencia de la ligación se realizó por digestión de los plásmidos aislados con la enzima *KpnI*. Aquellos plásmidos que contaban el inserto del tamaño adecuado fueron

secuenciados para su comprobación.

5.4 MUTAGENESIS DIRIGIDA

La mutagénesis dirigida es una técnica que permite la introducción de mutaciones en puntos específicos conocidos. En nuestro caso, se realizó el cambio de una guanina por una citosina en la posición 615 del cDNA de HNF1A, generando la mutación p.K205N, para lo que se utilizó el kit *QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene), que consta de tres etapas: PCR sobre el plásmido silvestre utilizando cebadores que introducen la mutación deseada, digestión del DNA parental y transformación (Figura 32).

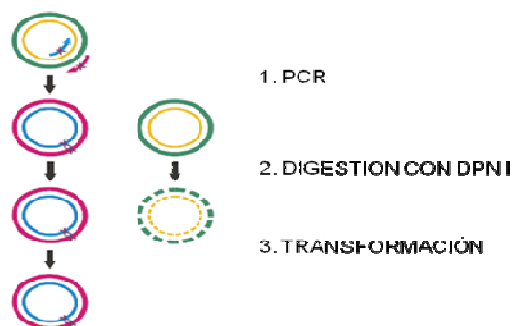


Figura 32. Esquema del proceso de mutagénesis dirigida, que consta de tres etapas: PCR, digestión de la construcción silvestre y transformación del mutante.

5.4.1 PCR

Para la realización de la PCR, se utilizó como DNA de partida el cDNA de HNF1A silvestre, clonado en el vector pCEFL. Esta construcción fue crecida y asilada en bacterias *E.coli* de la cepa DH5 α que metilan el DNA (dam+). Los cebadores utilizados para la mutagénesis fueron diseñados con el programa *QuickChange® Primer Design* (Stratagene), que permite el diseño de los cebadores óptimos para la realización de la mutagénesis (Tabla 5).

Tabla 5. Cebadores utilizados para la mutagénesis dirigida p.K205N. El nucleótido en negrita es el sitio de cambio para generar la mutación p.K205N.

CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENTIDO
5' CGGAGGAACCGTTTCAACTGGGGCCCA3'	5' TGGGCCCCA G TTGAAACGGTTCTCCG3'

El protocolo para la reacción de PCR fue el siguiente: 2,5µl de Buffer de reacción 10X, 50 ng de DNA molde (HNF1A-pCEFL), 10µM de cada uno de los cebadores, 200 µM de cada dNTPs y 0,5 µl Pfu Ultra HF (1,25 U/µl), en un volumen final de 25 µL. El programa de amplificación empleado fue el siguiente:

95°C.....	30''	} X16
95°C.....	30''	
55°C.....	1'	
68°C.....	8'	

Una alícuota del producto de PCR fue separada en gel de agarosa al 1% para comprobar la el resultado de la amplificación.

5.4.2 DIGESTION CON DPN I

El producto de PCR fue digerido con la enzima DpnI, que reconoce DNA metilado; de esta manera, se elimina el DNA parental dejando intacta la construcción con la mutación. La digestión se realizó con 1µl de DpnI (10U/µl) y se incubó durante 1h a 37°C

5.4.3 TRANSFORMACIÓN EN LAS CELULAS SUPERCOMPETENTES XL-1 BLUE

La transformación de la digestión anterior fue realizada en la cepa de células supercompetentes XL-1 Blue suministradas por el kit comercial. Para

ello se utilizó una alícuota de 50 μ l de bacteria y 1 μ l del producto de la digestión con DpnI. La mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos y, posteriormente, se sometió a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Tras el choque térmico, la reacción se incubó durante 2 minutos en hielo, se añadió 500 μ l de medio LB líquido y se incubó durante 1 hora a 37°C en agitación (225 rpm). Finalmente, la mezcla se sembró en una placa de medio LB con ampicilina y se dejó crecer a 37°C durante 20 horas.

Las colonias crecidas se sembraron en 5 ml de medio LB líquido durante 6 horas y la extracción de DNA plasmídico se realizó con el procedimiento anteriormente descrito.

Los plásmidos obtenidos se secuenciaron para su comprobación.

5.5 TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE LAS CÉLULAS COS-1 Y HEPG2

Las líneas celulares empleadas en el estudio de la caracterización funcional de la mutación p.K205N y de las nuevas isoformas aisladas del gen HNF1A fueron COS-1 (fibroblastos de mono verde africano) y HepG2. Ambas líneas celulares fueron crecidas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Lonza) suplementado con 10% FBS (suero bovino fetal) y 1% de Penicilina/Estreptomicina a 37°C y 5% de atmósfera de CO₂.

La transfección transitoria se llevó a cabo en el momento que las células alcanzaron el 70-80% de confluencia, en una placa multipocillo de 6 pocillos. El método empleado para la transfección fue *FuGene HD* (Roche), que es una combinación de lípidos y otros componentes que permiten la transfección de hasta 2 μ g de DNA. Para cada pocillo se preparó una mezcla de reacción que contenía 20 ng del plásmido utilizado como control interno pRL-SV40 (plásmido que contiene el gen reportero de renilla), 1000 ng de la construcción que contenía el promotor de GLUT2 en pGL3-Basic y 980 ng de pCEFL, bien con HNF1A silvestre, bien con cada una de las variantes estudiadas, o bien el vector vacío, diluidos en 100 μ l de medio DMEM sin suplementar (Figura 33). A

esta mezcla se añadieron 5 µl de FuGene HD y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Cada una de las mezclas se repartió a los pocillos correspondientes y se mantuvo durante 24 horas.

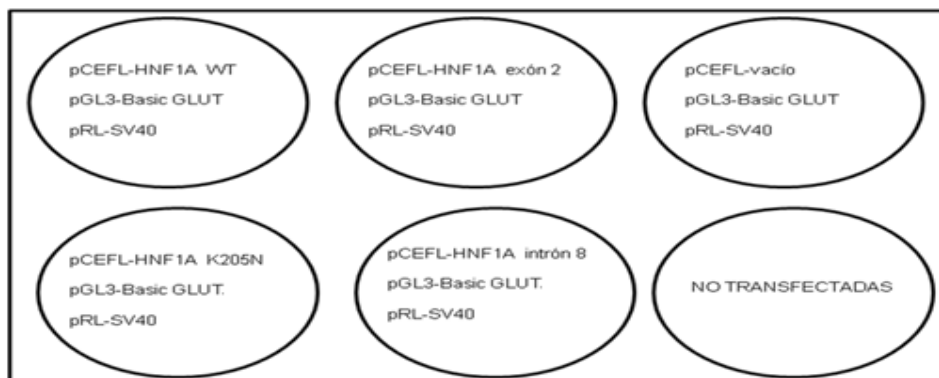


Figura 33. Esquema de la realización de la transfección. En cada pocillo se transfectó cada uno de los cDNAs de HNF1A clonados en el vector pCEFL, junto con uno de los promotores, y el vector utilizado como control interno pRL-SV40

5.6 ENSAYO DE LUCIFERASA

Mediante la utilización del ensayo de actividad luciferasa, quisimos comprobar la capacidad de unión que tienen la proteína HNF1A con la mutación p.K205N, así como las isoformas HNF1A $\Delta 2$ y HNF1A insIVS8, al promotor del gen de la GLUT2 midiendo la actividad del gen de la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*), que es controlado por este promotor. A su vez, medimos la actividad de la luciferasa de Renilla (*Renilla reniformis*) que utilizamos para normalizar los valores obtenidos, así como de control interno de la transfección. Debido a que ambos tipos de luciferasa presentan un origen evolutivo diferente es posible medir sus actividades simultáneamente y discriminar su actividad (Figura 34).

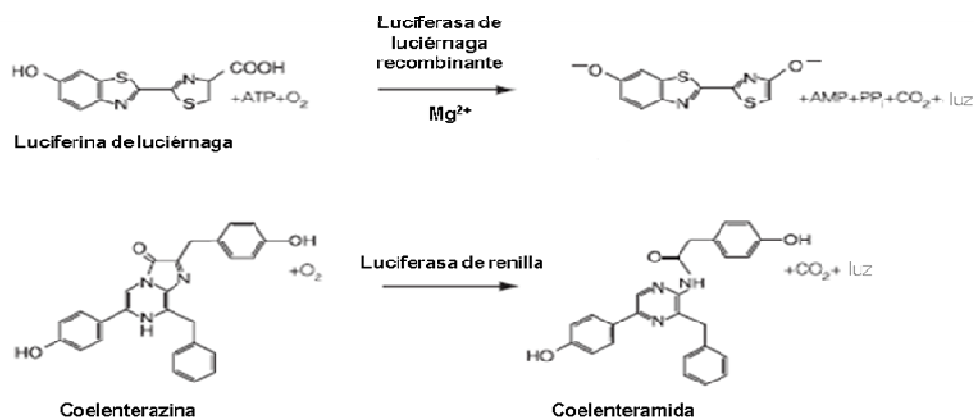


Figura 34. Reacciones de bioluminiscencia catalizadas por la luciferasas de luciérnaga y renilla

La actividad luciferasa fue medida a las 24 horas de la transfección y el kit utilizado fue *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega). El luminómetro empleado fue el modelo FB12 de Berthold y se programó con un retraso en la medida de 2 segundos seguido de un período de 10 segundos para la medida en cada muestra. El procedimiento para utilizado fue el siguiente: las células, previamente lavadas dos veces con PBS, fueron lisadas con buffer de lisis pasivo (PLB) a concentración 1X en un volumen de 250 μl por pocillo. Las células fueron levantadas de la placa mediante una pipeta y pasadas a viales, donde fueron sometidas a dos ciclos de congelación-descongelación a 80°C y 37°C de 5 minutos cada uno, para acelerar la lisis celular. Posteriormente, los lisados celulares fueron centrifugados a máxima velocidad durante un minuto. Se tomaron 20 μl de este lisado y se mezclaron con 100 μl de LARII, que contiene el sustrato de la luciferasa de luciérnaga, y se midió la luz desprendida. Posteriormente, se añadieron 100 μl del reactivo *Stop & Glo* a concentración 1X, que contiene el sustrato para la luciferasa de renilla a la vez que detiene la reacción de la luciferasa de luciérnaga, y se midió la luz desprendida. El valor real de luciferasa se obtuvo de dividir el valor obtenido en la luciferasa de luciérnaga por el valor de renilla.

El ensayo fue repetido tres veces y como control negativo se utilizaron células sin transfectar.

6. PROGRAMAS BIOINFORMATICOS

6.1 PROGRAMAS ESTADISTICOS

La estadística descriptiva nos permite comparar los diferentes grupos estudiados mediante los datos obtenidos de su análisis y los porcentajes que se desprenden de esos datos. Sin embargo, para determinar si realmente existen diferencias significativas entre los grupos de pacientes estudiados debemos calcular la Chi-Cuadrado de Pearson, que nos permite determinar si existen diferencias significativas para una misma característica entre dos grupos diferentes.

Para la obtención de estos valores es necesaria la utilización de aplicaciones informáticas. En este estudio empleamos el programa informático SPSS 13.0, que nos permite comparar valores entre dos grupos diferentes y determinar la existencia de diferencias significativas entre ambos.

Para la determinación de la asociación de haplotipos de los distintos polimorfismos de los genes estudiados se empleó el programa THESIAS 2.1. Este programa se basa en el modelo de probabilidad máxima y en su vinculación al algoritmo SEM. El algoritmo SEM es un algoritmo iterativo donde en cada iteración, un par de haplotipos ambiguos, considerados como datos ausentes, es reemplazado por un valor simulado creado desde su distribución condicional dado de los datos observados y de los parámetros obtenidos de la iteración previa. THESIAS permite la estimación simultánea de frecuencias de haplotipos y sus efectos asociados sobre el fenotipo de interés.

Para los datos obtenidos del ensayo de luciferasa se empleó un distribución t-Student ya que lo que se quería comparar eran las medias aritméticas de los valores normalizados de luciferasa en cada una de las muestras medidas, para lo que se utilizó el programa GRAPHPAD PRISM 5.0.

6.2 ANALISIS DE SECUENCIAS

El programa empleado para en análisis de secuencias fue *Chromas Lite*, que permite la visualización de los archivos cromatográficos procedentes del secuenciador de Applied Biosystems, entre otros. El programa despliega una serie de picos debajo del cromatograma que permite ver los archivos de genotipado.

El análisis de la conservación interespecífica de la secuencia proteica en HNF1A se llevó a cabo mediante el programa informático *ClustalW* (<http://align.genome.jp/>), introduciendo las secuencias a comparar en formato FASTA. El programa *ClustalW* permite el alineamiento de múltiples secuencias de DNA o proteínas, permitiendo ver las similitudes o diferencias entre las secuencias alineadas.

6.3 PROGRAMAS DE PREDICCIÓN DE PATOGENICIDAD DE MUTACIONES

El estudio del comportamiento teórico de la mutación p.K205N en HNF1A se llevó a cabo mediante el empleo de tres programas informáticos (SIFT, PolyPhen y Pmut).

6.3.1 POLYPHEN (Polymorphism Phenotyping)

(<http://www.bork.emblheidelberg.de/PolyPhen>)

Este programa predice el posible impacto de una sustitución aminoacídica en la estructura y función de una proteína humana, empleando consideraciones físicas y comparativas (Nakken et al., 2007).

La secuencia de la proteína se introduce en el programa en formato FASTA. Se lleva a cabo un alineamiento de la misma con las secuencias pertenecientes a las proteínas homólogas en las especies que se encuentren descritas en BLAST. El resultado del alineamiento múltiple es empleado por el

software PSIC (Position-Specific Independent Counts) para calcular la matriz del perfil. Los elementos de la matriz (valores del perfil) son ratios logarítmicos que indican la probabilidad de que en una posición determinada se encuentre un aminoácido, frente a que este aminoácido se localice en cualquier posición (frecuencia de fondo). El programa PolyPhen analiza los valores absolutos de la diferencia entre los valores de perfil de las dos variantes alélicas en la posición polimórfica. Un valor muy alto de esta diferencia podría indicar que la sustitución estudiada aparece poco o nada en la familia de proteínas. PolyPhen también muestra el número de secuencias alineadas en la posición de búsqueda. Este número indica la credibilidad de los cálculos del valor del perfil.

Los resultados del estudio pueden determinar que el cambio es:

- Probablemente patogénico: existe una gran probabilidad de que afecte a la estructura o a la función de la proteína.
- Posiblemente patogénico: se cree que podría afectar a la función o estructura de la proteína.
- Benigno: es muy probable que carezca de efecto fenotípico.
- Desconocido: en algunos casos, la carencia de datos no permite que el programa pueda hacer una predicción.

6.3.2. PMUT

(<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>)

Es un programa que predice si una mutación puede ser patogénica o neutral. Se basa en las características de la secuencia y en un software de una o dos redes neurales NN (neural network), que emplean bases de datos internas, predicción de estructura secundaria y conservación de la secuencia. Proporciona una respuesta afirmativa o negativa y un índice de fiabilidad (Ferrer-Costa, 2005).

Se introduce la secuencia proteica a estudiar en formato FASTA y se incluye la localización y el cambio aminoacídico que se produce. Proporciona resultados que varían en un rango de 0 a 1, donde un valor 0 indica que se

trata de una mutación neutral y los valores más altos son patogénicos. Esta aplicación incluye además un nuevo concepto, el de la fiabilidad. Se trata de un valor entre 0 (poco fiable) y 9 (muy fiable), cuyo significado es, que si una mutación se prevé como patogénica y tiene un valor de 9, esa predicción es muy fiable y es muy probable que se trate realmente de una mutación patogénica. Lo mismo ocurre con las mutaciones neutrales. También se muestra la mutación en relación a la estructura proteica. La tasa de error por falsos positivos es de un 21% y por falsos negativos es de un 17%. Si se incluye la estructura de la proteína, la tasa de falsos positivos se reduce a un 12% y la de falsos negativos a un 10%.

6.3.3 SIFT (Sorting intolerant from tolerant)

(<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>)

El programa SIFT es una herramienta que clasifica las sustituciones de aminoácidos en una proteína dada y predice si estos cambios provocarán un efecto fenotípico en la proteína.

SIFT se basa en la premisa de que los aminoácidos importantes de una proteína están conservados en la evolución, por lo que cambios en los mismos deben afectar a la funcionalidad de la proteína. Con una secuencia proteica dada, SIFT escoge proteínas relacionadas y obtiene un alineamiento múltiple de estas con la proteína a analizar, y basándose en los aminoácidos presentes en cada posición del alineamiento realiza una predicción de las sustituciones que afectarán a la función de la proteína. Las sustituciones en una posición conservada en el alineamiento serán consideradas como “no tolerables” para la mayoría de los cambios, mientras que las posiciones que no están conservadas en el alineamiento tolerarán mejor los cambios de aminoácido (Ng y Henikoff, 2001).

Se introduce la secuencia a analizar en formato FASTA y el programa primero busca secuencias similares a la introducida por nosotros, después escoge secuencias estrechamente relacionadas que puedan tener una función similar a la nuestra, y luego obtiene el alineamiento de las secuencias

escogidas. Por último, calcula las probabilidades normalizadas para todas las posibles sustituciones del alineamiento. Las sustituciones con una puntuación menor de 0,05 serán clasificadas como deletéreas, y las de puntuación mayor o igual a 0,05 “tolerables” o neutrales.

La precisión de las predicciones de SIFT es del 60-80%, obteniéndose un 30% aproximadamente de falsos positivos. No obstante, la precisión de las predicciones depende del alineamiento que se obtenga en cada caso.

6.4 PROGRAMA DE PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS

Para la predicción de la estructura tridimensional de la isoforma HNF1A insIVS8, así como la de las proteínas resultantes de las mutaciones no descritas en el gen GCK, se utilizó el programa *3D-JIGSAW*, (<http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw/>), el cual utiliza como modelo predictivo estructuras homólogas de proteínas conocidas. Para la visualización de estas estructuras se emplearon los programas *RasMol* y *Pymol*

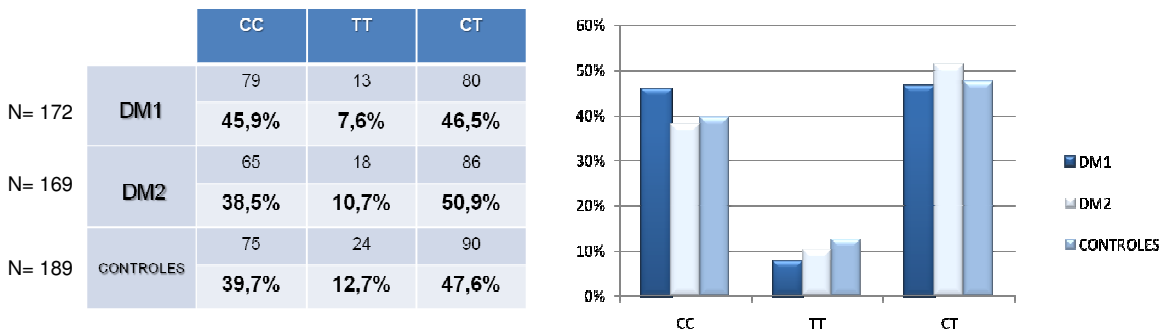
4. RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS ASOCIADAS A SUSCEPTIBILIDAD AL DESARROLLO DE DIABETES

1.1 ESTUDIO DE GENES DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS

1.1.1 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO -511 C>T DEL GEN IL1B (rs16944)

El estudio del polimorfismo -511C>T del gen IL1B en la población seleccionada en nuestro trabajo mostró que no había diferencias significativas entre los grupos de pacientes con DM1, DM2 y controles (Figura 35).



DM1 vs CONTROLES $p= 0,205$

DM2 vs CONTROLES $p= 0,761$

DM1 vs DM2 $p= 0,308$

Figura 35. Distribución de genotipos del polimorfismo -511 C>T del gen IL1B en las poblaciones de pacientes con DM1, pacientes con DM2 y controles

Tampoco mostró diferencias significativas el estudio de la agrupación de genotipos en los tres grupos de población estudiados en nuestro trabajo (Figura 36).

	CC+CT	TT		TT+CT	CC
DM1	159	13	DM1	93	79
	92,4%	7,6%		54,1%	45,9%
DM2	151	18	DM2	104	65
	89,3%	10,6%		61,5%	38,5%
CONTROLES	165	24	CONTROLES	114	75
	87,3%	12,7%		60,3%	39,7%

DM1 vs CONTROLES $p=0,108$ DM1 vs CONTROLES $p=0,231$ DM2 vs CONTROLES $p=0,321$ DM2 vs CONTROLES $p=0,813$ DM1 vs DM2 $p=0,548$ DM1 vs DM2 $p=0,163$

Figura 36. Distribución por agrupación de genotipos del polimorfismo -511 C>T de IL1B en las poblaciones de DM1, DM2 y controles.

1.1.2 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO -174 G>C DEL GEN IL6 (rs1800795).

Los genotipos del polimorfismo -174 G>C del gen IL6 mostraron una distribución parecida entre los tres grupos de población estudiados (Figura 37).

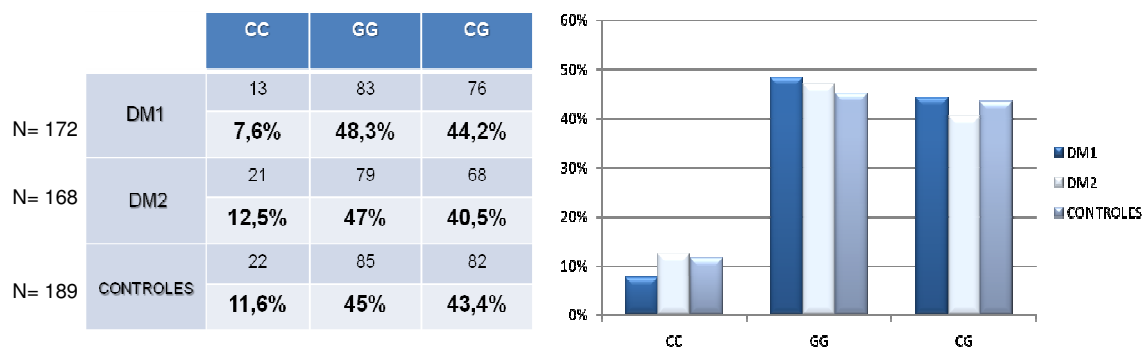
DM1 vs CONTROLES $p=0,413$ DM2 vs CONTROLES $p=0,854$ DM1 vs DM2 $p=0,304$

Figura 37. Distribución de genotipos del polimorfismo -174 C>G del gen IL6 en las poblaciones de pacientes con DM1, pacientes con DM2 y controles.

En el estudio de la agrupación de genotipos de este polimorfismo tampoco se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones de pacientes con DM1, DM2 y controles (Figura 38).

	CC+CG	GG		GG+CG	CC
DM1	89	83	DM1	159	13
	51,7%	48,3%		92,4%	7,6%
DM2	89	79	DM2	147	21
	53%	47%		87,5%	12,5%
CONTROLES	104	85	CONTROLES	167	22
	55%	45%		88,4%	11,6%

DM1 vs CONTROLES $p = 0,532$ DM1 vs CONTROLES $p = 0,190$ DM2 vs CONTROLES $p = 0,698$ DM2 vs CONTROLES $p = 0,803$ DM1 vs DM2 $p = 0,820$ DM1 vs DM2 $p = 0,129$

Figura 38. Distribución por distribución de genotipos del polimorfismo -174 C>G del gen IL6 en las poblaciones de DM1, DM2 y controles.

1.1.3 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO -238 A>G DEL GEN TNFA (rs361525)

El estudio del polimorfismo -238 A>G del gen TNFA mostró diferencias significativas entre el grupo de pacientes con DM1 y los controles, el grupo de pacientes con DM2 y los controles y entre los dos grupos de diabéticos, de forma que el genotipo AA solo aparece en la población de pacientes con DM1, mientras que el genotipo AG presenta mayor frecuencia en la población de pacientes con DM2 en relación con los controles (Figura 39).

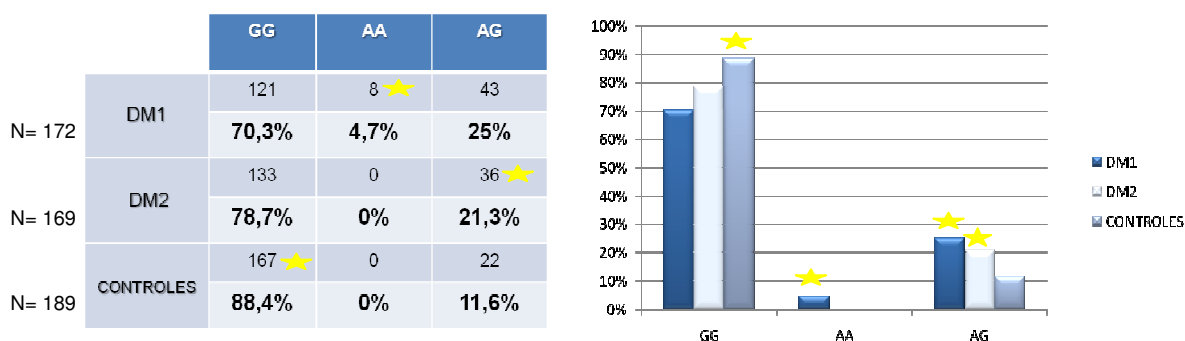
DM1 vs CONTROLES $p < 0,001$ DM2 vs CONTROLES $p = 0,013$ DM1 vs DM2 $p = 0,010$

Figura 39. Distribución de genotipos del polimorfismo -238 G>A del gen TNFA en las poblaciones de pacientes con DM1, pacientes con DM2 y controles.

El estudio de la agrupación de genotipos también mostró diferencias significativas, siendo el alelo A más frecuente en las poblaciones de pacientes con DM1 ($p < 0,001$; OR=0,313 (0,180-0,543)) y pacientes con DM2 ($p = 0,013$; OR=0,487 (0,273-0,887)). Las diferencias entre pacientes con DM1 y pacientes con DM2 estriban en que los homocigotos A están presentes únicamente en el grupo de diabéticos tipo 1 (Figura 40).

	AA+AG	GG		GG+AG	AA
DM1	51	121	DM1	164 ★	8 ★
	29,7%	70,3%		95,3%	4,7%
DM2	36	133	DM2	169	0
	21,3%	78,7%		100%	0%
CONTROLES	22 ★	167	CONTROLES	189	0
	11,6%	88,4%		100%	0%

DM1 vs CONTROLES $p < 0,001$

(OR=0,313 (0,180-0,543))

DM2 vs CONTROLES $p = 0,013$

(OR= 0,487 (0,273-0,867))

DM1 vs DM2 $p = 0,077$

DM1 vs CONTROLES $p = 0,003$

(OR= 1,045 (1,015-1,084))

DM2 vs CONTROLES $p = 1$

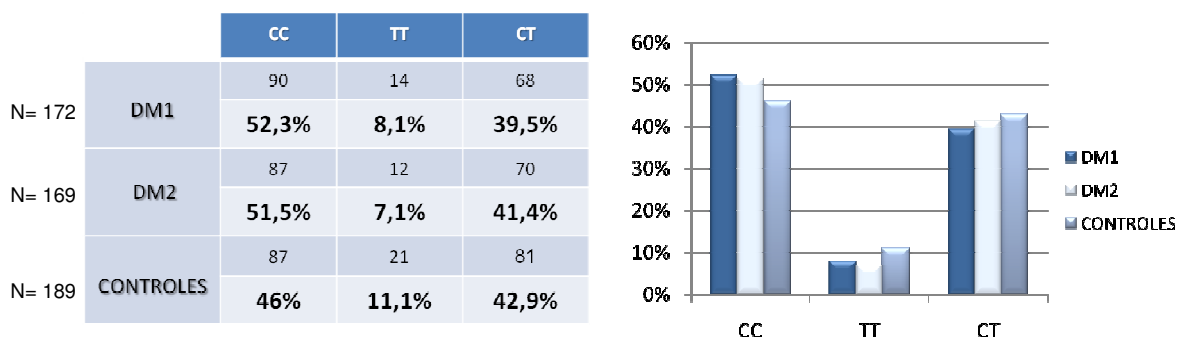
DM1 vs DM2 $p = 0,005$

(OR= 0,953 (0,923-0,985))

Figura 40. Distribución por agrupación de genotipos del polimorfismo -238 G>A del gen TNFA

1.1.4 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO -1C>T DEL GEN CD40 (rs1883832)

El estudio del polimorfismo -1C>T del gen CD40 en la población seleccionada en nuestro trabajo no mostró diferencias significativas en la distribución de genotipos entre los grupos de pacientes con DM1, pacientes con DM2 y los controles (Figura 41).



DM1 vs CONTROLES $p= 0,409$

DM2 vs CONTROLES $p= 0,342$

DM1 vs DM2 $p= 0,902$

Figura 41. Distribución de genotipos en las poblaciones DM1, DM2 y controles para el polimorfismo -1T>C del gen CD40.

El estudio del polimorfismo agrupando los genotipos tampoco mostró diferencias significativas entre los tres grupos de población estudiados (Figura 42).

	CC+CT	TT
DM1	158 91,9%	14 8,1%
DM2	157 92,9%	12 7,1%
CONTROLES	168 88,9%	21 11,1%

	TT+CT	CC
DM1	82 44,6%	90 50,8%
DM2	82 48,5%	87 51,5%
CONTROLES	102 55,4%	87 49,2%

DM1 vs CONTROLES $p= 0,341$

DM2 vs CONTROLES $p= 0,190$

DM1 vs DM2 $p= 0,718$

DM1 vs CONTROLES $p= 0,232$

DM2 vs CONTROLES $p= 0,303$

DM1 vs DM2 $p= 0,876$

Figura 42. Distribución de la agrupación de genotipos del polimorfismo -1C>T del gen CD40

1.1.5 ESTUDIO DE HAPLOTIPOS DE LOS POLIMORFISMOS -511 C>T DEL GEN IL-1B, -174 G>C DEL GEN IL-6, -238 A>G DEL GEN TNF- α Y -1 C>T DEL GEN CD40

El estudio de haplotipos de los polimorfismos -511 C>T del gen IL1B, -1 C>T del gen CD40, -174 C>G del gen IL6 y -238 A>G del gen TNFA, mostró que el haplotipo formado por el alelo C del gen IL1B, el alelo C del gen CD40,

el alelo G del gen IL6 y el alelo A del gen TNFA (CCGA) se encontró con mayor frecuencia en la población de pacientes con DM1 en relación con los controles ($p=0,02$; $OR= 3,98 (1,15-13,77)$), mientras que el haplotipo constituido por los alelos CTCG de los genes IL-1B, CD40, IL-6 y TNF- α , se halló con mayor frecuencia en controles respecto a los de pacientes con DM1 ($p= 0,024$; $OR= 0,437 (0,21-0,90)$). No se encontraron diferencias entre el grupo de pacientes con DM2 y controles, ni entre las dos poblaciones de diabéticos (Tabla 6).

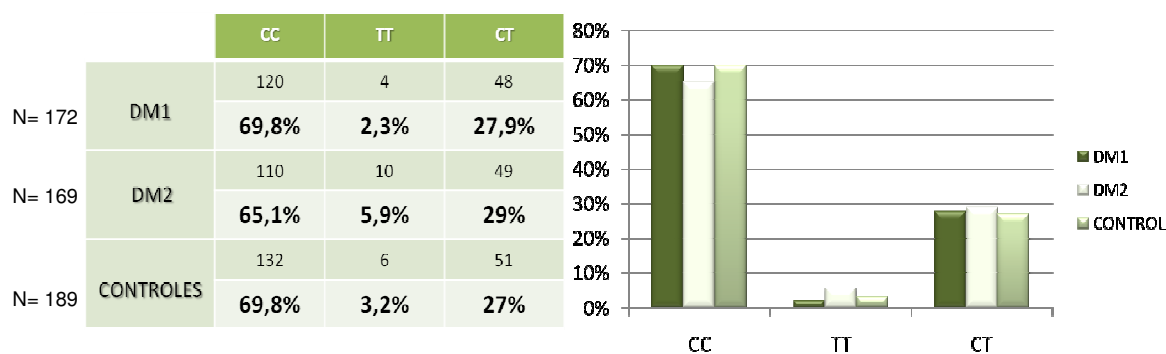
Tabla 6. Frecuencias haplotípicas en controles, DM1 y DM2 de los polimorfismos estudiados. Ninguno de estos haplotipos muestra asociación con susceptibilidad a diabetes.

HAPLOTIPO IL1B- CD40-IL6-TNF α	FRECUENCIA CONTROLES	FRECUENCIA DM1	FRECUENCIA DM2
CCCG	0,130	0,110	0,082
CCCA	0,011	0,034	0,030
CCGG	0,266	0,288	0,285
CCGA	0,022	0,079	0,050
CTCG	0,101	0,059	0,094
CTGG	0,103	0,105	0,094
CTGA	0,008	0,013	0,014
TCCG	0,067	0,071	0,093
TCGG	0,166	0,126	0,165
TCGA	0,011	0,009	0,012
TTCG	0,023	0,021	0,026
TTGG	0,083	0,063	0,051
TTGA	0,013	0,016	0,011

1.2 ESTUDIO DE GENES DE CITOQUINAS ANTIINFLAMATORIAS

1.2.1 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO -33 C>T DEL GEN IL4 (rs2070874).

En el estudio de la distribución de los genotipos del polimorfismo -33 C>T del gen IL4 no se observaron diferencias significativas entre las poblaciones de pacientes con DM1, pacientes con DM2 y controles (Figura 43).



DM1 vs CONTROLES $p=0,877$

DM2 vs CONTROLES $p=0,381$

DM1 vs DM2 $p=0,224$

Figura 43. Distribución de genotipos del polimorfismo -33 C>T del gen IL4 en las poblaciones de pacientes con DM1, pacientes con DM2 y controles.

El estudio por agrupación de genotipos tampoco mostró diferencias significativas entre los grupos de población estudiados (Figura 44).

	CC+CT	TT		TT+CT	CC
DM1	168 97,7%	4 2,3%	DM1	52 30,2%	120 69,8%
DM2	159 94,1%	10 5,9%	DM2	59 34,9%	110 65,1%
CONTROLES	183 96,8%	6 3,2%	CONTROLES	57 30,2%	132 69,8%

DM1 vs CONTROLES $p=0,623$

DM2 vs CONTROLES $p=0,210$

DM1 vs DM2 $p=0,095$

DM1 vs CONTROLES $p=0,988$

DM2 vs CONTROLES $p=0,337$

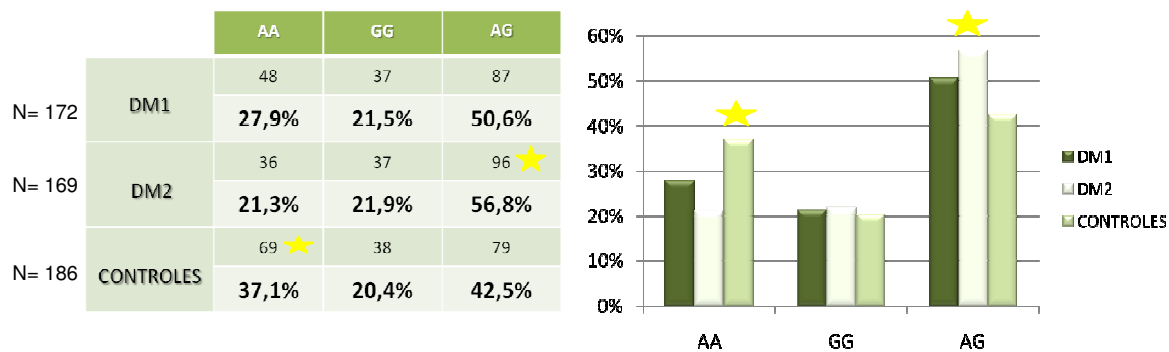
DM1 vs DM2 $p=0,357$

Figura 44. Distribución por agrupación de genotipos del polimorfismo -33C>T del gen IL4

1.2.2 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO 223 A>G DEL GEL IL4R (rs1850109)

En el estudio del polimorfismo 223 A>G del gen IL4R se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones de pacientes con DM2 y controles, ya que la frecuencia del genotipo AA era mayor en el grupo de controles, mientras que el genotipo AG presentaba mayor frecuencia en la población de pacientes con DM2. Sin embargo, no se encontraron diferencias

entre pacientes con DM1 y controles, ni entre pacientes con DM1 y pacientes con DM2 (Figura 45).



DM1 vs CONTROLES $p= 0,163$

DM2 vs CONTROLES $p= 0,004$

DM1 vs DM2 $p= 0,345$

Figura 45. Representación de los genotipos en las poblaciones de DM1, DM2 y controles en el polimorfismo 223 A>G del gen IL4R.

El estudio por agrupación de genotipos también mostró diferencias significativas debido a que el alelo G se encontró en mayor proporción en la población de pacientes con DM2 respecto a la población control ($p= 0,001$; $OR=0,459$ ($0,286-0,737$)). Con respecto a los pacientes con DM1, se observó que la proporción del alelo G también es mayor en este grupo en relación con los controles aunque sin llegar a haber diferencias significativas entre ellos (Figura 46).

	AA+AG	GG
DM1	135	37
	78,5%	21,5%
DM2	132	37
	78,1%	21,9%
CONTROLES	148	38
	79,6%	20,4%

	GG+AG	AA
DM1	124	48
	72,1%	27,9%
DM2	133 ★	36
	78,7%	21,3%
CONTROLES	117	69
	62,9%	37,1%

DM1 vs CONTROLES $p= 0,802$

DM2 vs CONTROLES $p= 0,736$

DM1 vs DM2 $p= 0,932$

DM1 vs CONTROLES $p= 0,064$

DM2 vs CONTROLES $p= 0,001$

($OR=0,459$ ($0,286-0,737$))

DM1 vs DM2 $p= 0,157$

Figura 46. Distribución por agrupación de genotipos del polimorfismo 223 A>G del gen IL4.

1.2.3 ESTUDIO DE HAPLOTIPOS DE LOS POLIMORFISMOS -33 C>T DEL GEN IL4 Y 223 A>G DEL GEN IL4R

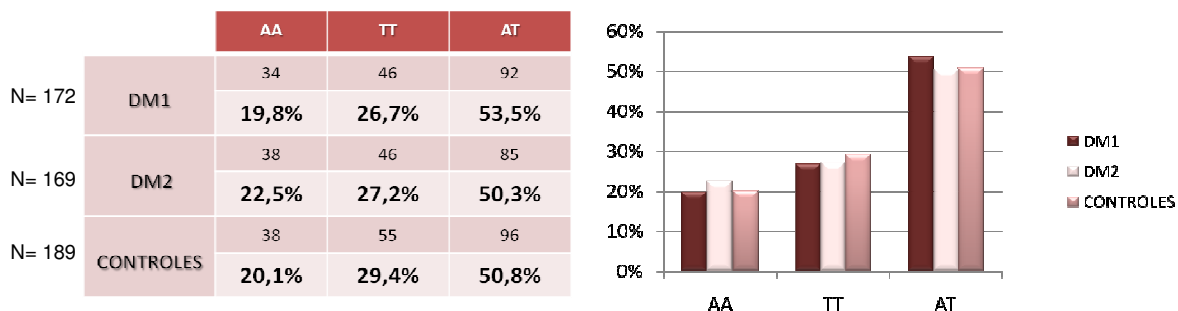
El estudio de haplotipos de los polimorfismos -33 C>T del gen IL4 y 223 A>G del IL4R mostró que el haplotipo formado por el alelo T de la variante del gen IL4 y el alelo G del polimorfismo del gen IL4R está más representado en el grupo de pacientes con DM2 al compararlo tanto con la población control ($p=0,006$; OR= 2,44 (1,28-4,63), como con la población de pacientes con DM1 ($p=0,012$; OR= 2,22 (1,19-2,16) (Tabla 7).

Tabla 7. Frecuencias haplotípicas de los polimorfismos -33 del gen IL-4 y 223 del gen IL-4R

HAPLOTIPO IL-4, IL4-R	FRECUENCIA CONTROLES	FRECUENCIA DM1	FRECUENCIA DM2
CA	0,460	0,427	0,405
CG	0,352	0,409	0,390
TA	0,101	0,104	0,091
TG	0,065	0,058	0,112

1.3. ESTUDIO DEL POLIMORFISMO -251 A>T DEL GEN IL8 (rs4073)

El estudio del polimorfismo -251 A>T del gen IL8 no mostró diferencias significativas entre los grupos de los pacientes con DM1, los pacientes con DM2 y los controles (Figura 47).



DM1 vs CONTROLES $p=0,857$

DM2 vs CONTROLES $p=0,838$

DM1 vs DM2 $p=0,790$

Figura 47. Distribución de genotipos del polimorfismo -251 A>T de IL8 en las poblaciones de pacientes con DM1, pacientes con DM2 y los controles.

Tampoco se hallaron diferencias significativas entre los tres grupos de población incluidos en nuestro trabajo en el estudio por agrupación de genotipos (Figura 48).

	AA+AT	TT		TT+AT	AA
DM1	126	46	DM1	138	34
	73,3%	26,7%		80,2%	19,8%
DM2	123	46	DM2	131	38
	72,8%	27,2%		77,5%	22,5%
CONTROLES	134	55	CONTROLES	151	38
	70,9%	29,1%		79,9%	20,1%

DM1 vs CONTROLES p= 0,618 DM1 vs CONTROLES p= 0,936

DM2 vs CONTROLES p= 0,693 DM2 vs CONTROLES p= 0,583

DM1 vs DM2 p= 0,921 DM1 vs DM2 p= 0,539

Figura 48. Distribución por agrupación de genotipos del polimorfismo -251 A>T del gen IL8.

1.3.1 ESTUDIO DE HAPLOTIPOS DE LOS POLIMORFISMOS -1C>T DEL GEN CD40 Y -251 T>A DEL GEN IL8

El estudio por haplotipos de los polimorfismos -1C>T del gen CD40 y -251 A>T del gen IL8 no mostró diferencias significativas entre las tres poblaciones estudiadas (Tabla 8).

Tabla 8. Frecuencias haplotípicas de los polimorfismos -1C>T del gen CD40 y -251 A>T del gen IL8

HAPLOTIPO CD40-IL8	FRECUENCIA CONTROLES	FRECUENCIA DM1	FRECUENCIA DM2
CA	0,303	0,328	0,304
CT	0,371	0,392	0,369
TA	0,151	0,136	0,150
TT	0,173	0,142	0,147

1.3.2 ESTUDIO DE HAPLOTIPOS DE LOS POLIMORFISMOS -174 C>G DEL GEN IL6, -238 A>G DEL GEN TNFA, -511 C>T DEL GEN IL1B Y -251 A>T DEL GEN IL8

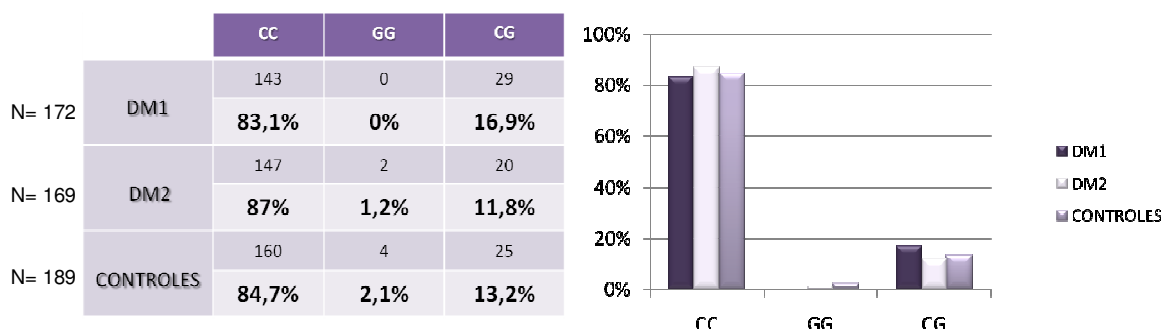
En el estudio de haplotipos de las variantes -174 C>G del gen IL6, -238 A>G del gen TNFA, -511 C>T del gen IL1B y -251 A>T del gen IL8 se observó que el haplotipo compuesto por el alelo C del polimorfismo del gen IL6, el alelo A del polimorfismo del gen TNFA, el alelo C de la variante del gen IL1B y el alelo T del polimorfismo del gen IL8 se encontró con más frecuencia en la población de pacientes con DM1 en relación con los controles ($p=0,02$; $OR=13,91$ (1,32-146,5)) mientras que el haplotipo CGCT se encontró con mayor frecuencia en la población control, tanto en relación con el grupo de pacientes con DM1 ($p=0,007$; $OR=0,240$ (0,08-0,679)), como con el grupo de pacientes con DM2 ($p=0,0016$; $OR=0,260$ (0,112-0,601)). Además, el haplotipo compuesto por los alelos GGTT se encontró con una diferencia significativamente mayor en la población control en relación con la población de pacientes con DM2 ($p=0,015$; $OR=0,352$ (0,150-0,822)) (Tabla 9).

Tabla 9. Frecuencias haplotípicas de los polimorfismos -174 C>G del gen IL6, -238 A>G del gen TNFA, -511 C>T del gen IL1B y -251 A>T del gen IL8

HAPLOTIPO IL-6, TNF α , IL-1B, IL-8	FRECUENCIA CONTROLES	FRECUENCIA DM1	FRECUENCIA DM2
CGCA	0,054	0,092	0,099
CGCT	0,178	0,079	0,063
CGTA	0,068	0,064	0,033
CGTT	0,016	0,054	0,036
CACA	0,010	0,022	0,020
CACT	0,004	0,015	0,054
GGCA	0,196	0,153	0,148
GGCT	0,160	0,226	0,175
GGTA	0,114	0,131	0,088
GGTT	0,151	0,090	0,115
GACA	0,010	0,010	0,046
GA CT	0,020	0,036	0,036
GATT	0,013	0,020	0,025

1.4 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO 34 C>G DEL GEN PPARG (rs1801282)

En el estudio de distribución de genotipos del polimorfismo 34 C>G del gen PPARG no se observaron diferencias significativas entre las poblaciones de pacientes con DM1, pacientes con DM2 y los controles utilizadas en nuestro trabajo (Figura 49). Sin embargo, se observó que la población control no se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg debido a que la proporción del genotipo GG es superior a lo esperado (2,1% en la población control de nuestro estudio frente a 1,7% en HapMap-CEU).



DM1 vs CONTROLES $p= 0,108$

DM2 vs CONTROLES $p= 0,720$

DM1 vs DM2 $p= 0,159$

Figura 49. Distribución de genotipos del polimorfismo 34 C>G del gen PPARG en las poblaciones de pacientes con DM1, pacientes con DM2 y los controles.

El estudio por agrupación de genotipos tampoco mostró diferencias en la distribución de los mismos entre los tres grupos de población, aunque se apreció una tendencia a la significación entre los pacientes con DM1 en comparación con los controles, debido a la ausencia de homocigotos GG en la población de los pacientes con DM1 (Figura 50).

	CC+CG	GG		GG+CG	CC
DM1	172	0	DM1	29	143
	100%	0%		16,9%	83,1%
DM2	167	2	DM2	22	147
	98,8%	1,2%		13%	87%
CONTROLES	185	4	CONTROLES	29	160
	97,9%	2,1%		15,3%	84,7%

DM1 vs CONTROLES p= 0,055

DM1 vs CONTROLES p= 0,695

DM2 vs CONTROLES p= 0,492

DM2 vs CONTROLES p= 0,530

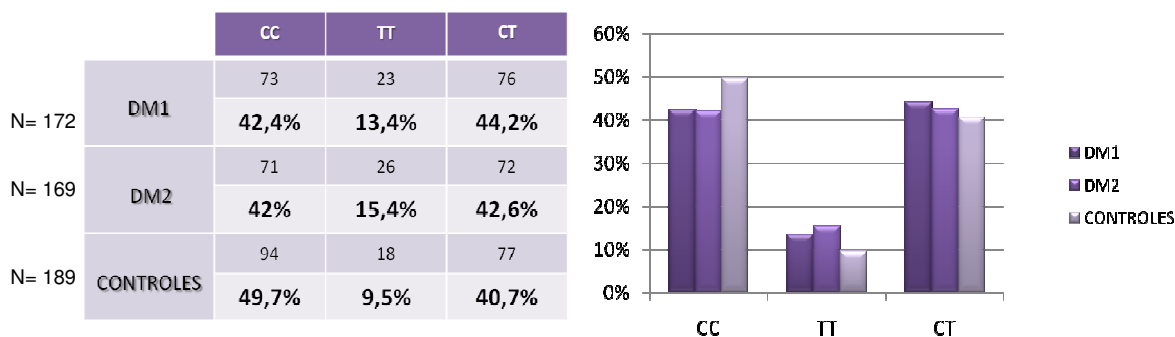
DM1 vs DM2 p= 0,152

DM1 vs DM2 p= 0,320

Figura 50. Distribucion por agrupación de genotipos del polimorfismo 34 C>G del gen PPARG

1.5 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO IVS3 C>T DEL GEN TCF7L2 (rs7903146)

El estudio del polimorfismo IVS3 C>T del gen TCF7L2 no mostró diferencias significativas entre las poblaciones de los pacientes con DM1, los pacientes con DM2 y la población control seleccionadas (Figura 51)



DM1 vs CONTROLES p= 0,292

DM2 vs CONTROLES p= 0,155

DM1 vs DM2 p= 0,864

Figura 51. Distribución de genotipos polimorfismo IVS3 C>T del gen TCF7L2 en las poblaciones de pacientes con DM1, pacientes con DM2 y controles.

Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos de población estudiados en el estudio por agrupación de genotipos (Figura 52).

	CC+CT	TT		TT+CT	CC
DM1	149	23	DM1	99	73
	86,6%	13,4%		57,6%	42,4%
DM2	143	26	DM2	98	71
	84,6%	15,4%		58%	42%
CONTROLES	171	18	CONTROLES	95	94
	90,5%	9,5%		50,3%	49,7%

DM1 vs CONTROLES $p=0,250$ DM1 vs CONTROLES $p=0,165$

DM2 vs CONTROLES $p=0,092$ DM2 vs CONTROLES $p=0,143$

DM1 vs DM2 $p=0,643$ DM1 vs DM2 $p=0,936$

Figura 52. Distribución por alelos del polimorfismo IVS3 C>T del gen TCF7L2.

1.6 ESTUDIO DE HAPLOTIPOS DE LOS POLIMORFISMOS 34 C>G DEL GEN PPARG E IVS3 C>T DEL GEN TCF7L2

El estudio de haplotipos de los polimorfismos 34 C>G del gen PPARG e IVS3 C>T del gen TCF7L2 mostró que el haplotipo formado por el alelo C del polimorfismo del gen PPARG y el alelo T de la variante del gen TCF7L2 es más frecuente tanto en pacientes con DM1 ($p=0,0472$ OR= 1,39 (1,01-1,92)) como en pacientes con DM2 ($p=0,032$ OR= 1,41 (1,02-1,94)); no se observaron diferencias entre las dos poblaciones de diabetes (Tabla 10).

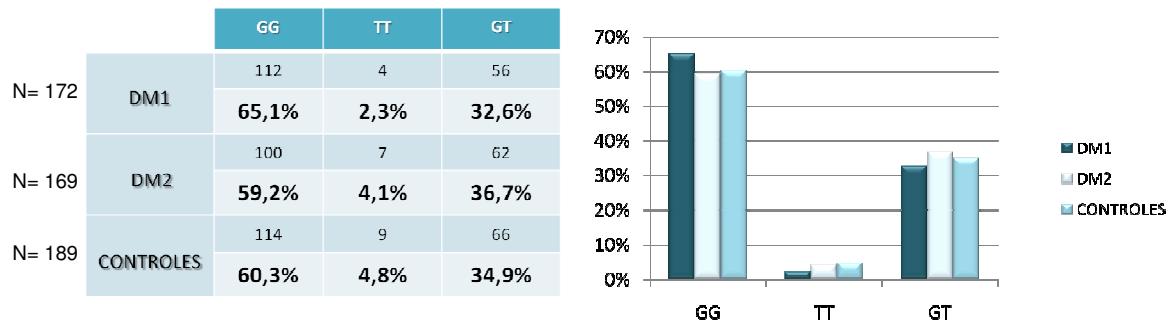
Tabla 10. Frecuencia de haplotipos encontradas en las poblaciones control, DM1 y DM2 de los genes PPARG y TCF7L2.

HAPLOTIPO PPARG-TCF7L2	FRECUENCIA CONTROLES	FRECUENCIA DM1	FRECUENCIA DM2
CC	0,639	0,569	0,581
CT	0,273	0,346	0,347
GC	0,061	0,075	0,051
GT	0,025	0,008	0,019

1.7 ESTUDIO DE GENES RELACIONADOS CON EL FUNCIONAMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR

1.7.1 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO 594 G>T DEL GEN EDN1 (rs5370)

El estudio de la distribución de genotipos del polimorfismo 594 G>T del gen EDN1 no mostró diferencias significativas entre los tres grupos de población estudiados (Figura 53).



DM1 vs CONTROLES $p=0,375$

DM2 vs CONTROLES $p=0,917$

DM1 vs DM2 $p=0,411$

Figura 53. Distribución de genotipos del polimorfismo 594 G>T del gen EDN1 en las poblaciones de pacientes con DM1, pacientes con DM2 y controles.

La distribución por agrupación de genotipos tampoco mostró resultados significativos entre los grupos de población estudiados en nuestro trabajo (Figura 54).

	GG+GT	TT
DM1	168	4
	97,7%	2,3%
DM2	162	7
	95,9%	4,1%
CONTROLES	180	9
	95,2%	4,8%

	TT+GT	GG
DM1	60	112
	34,9%	65,1%
DM2	69	100
	40,8%	59,2%
CONTROLES	75	114
	39,7%	60,3%

DM1 vs CONTROLES $p=0,215$

DM2 vs CONTROLES $p=0,777$

DM1 vs DM2 $p=0,343$

DM1 vs CONTROLES $p=0,347$

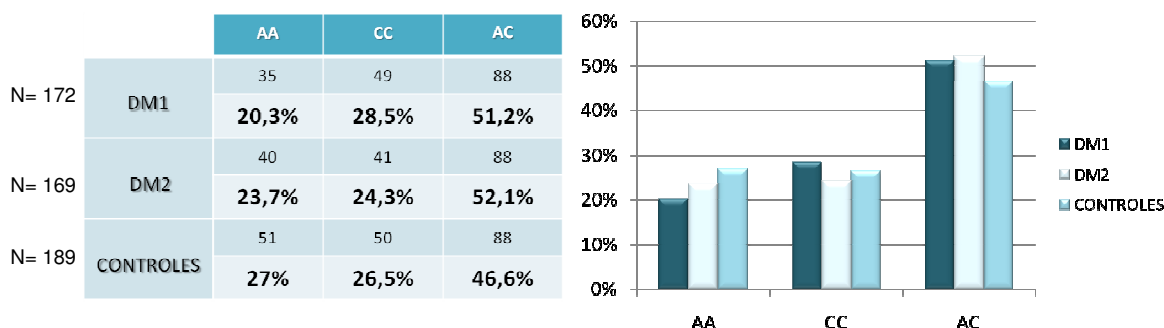
DM2 vs CONTROLES $p=0,825$

DM1 vs DM2 $p=0,258$

Figura 54. Distribución por alelos del polimorfismo 594 G>T del gen EDN1

1.7.2 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO -2578 A>C DEL GEN VEGF (rs699947)

El estudio del polimorfismo -2578 A>C del gen VEGF no mostró diferencias significativas entre los grupos de pacientes con DM1, pacientes con DM2 y los controles estudiados en nuestro trabajo (Figura 55).



DM1 vs CONTROLES $p=0,334$

DM2 vs CONTROLES $p=0,575$

DM1 vs DM2 $p=0,601$

Figura 55. Distribución de genotipos del polimorfismo -2578 A>C de VEGF en las poblaciones de pacientes con DM1, pacientes con DM2 y controles.

Tampoco mostró diferencias significativas el estudio de la agrupación de genotipos en los tres grupos de población estudiados (Figura 56).

	AA+AC	CC
DM1	123 71,5%	49 28,5%
DM2	128 74,7%	41 24,3%
CONTROLES	139 73,5%	50 26,5%

	CC+AC	AA
DM1	137 79,7%	35 20,3%
DM2	129 76,3%	40 23,7%
CONTROLES	138 73%	51 27%

DM1 vs CONTROLES $p=0,665$

DM2 vs CONTROLES $p=0,634$

DM1 vs DM2 $p=0,824$

DM1 vs CONTROLES $p=0,139$

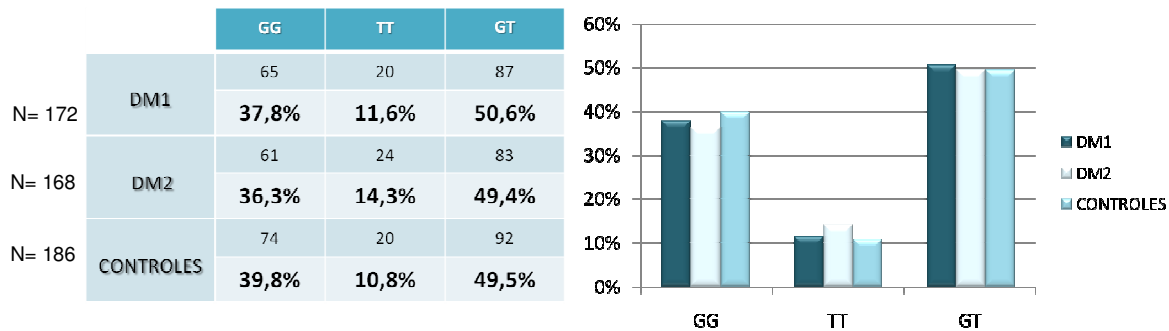
DM2 vs CONTROLES $p=0,472$

DM1 vs DM2 $p=0,459$

Figura 56. Distribución por agrupación de genotipos del polimorfismo -2578 del gen VEGF

1.7.3 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO 894 G>T DEL GEN NOS3 (rs1799983)

El estudio del polimorfismo 894 G>T del NOS3 no mostró diferencias significativas entre los grupos de pacientes con DM1, pacientes con DM2 y controles de la población seleccionada para nuestro trabajo (Figura 57).



DM1 vs CONTROLES $p= 0,916$

DM2 vs CONTROLES $p= 0,558$

DM1 vs DM2 $p= 0,778$

Figura 57. Distribución de genotipos del polimorfismo 894 G>T del gen NOS3 en las poblaciones de pacientes con DM1, pacientes con DM2 y controles.

En el estudio por agrupación de genotipos tampoco se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos de población estudiados (Figura 58)

	GG+GT	TT
DM1	152 88,4%	20 11,6%
DM2	144 85,7%	24 14,3%
CONTROLES	166 89,2%	20 10,8%

	TT+GT	GG
DM1	107 62,2%	65 37,8%
DM2	107 63,3%	62 36,7%
CONTROLES	112 60,2%	74 39,8%

DM1 vs CONTROLES $p= 0,793$

DM2 vs CONTROLES $p= 0,314$

DM1 vs DM2 $p= 0,479$

DM1 vs CONTROLES $p= 0,699$

DM2 vs CONTROLES $p= 0,501$

DM1 vs DM2 $p= 0,833$

Figura 58. Distribución alélica del polimorfismo 894 G>T del gen NOS3

1.7.4 ESTUDIO DE HAPLOTIPOS DE LOS POLIMORFISMOS 594 G>T DEL GEN EDN1, -2578 A>C DEL GEN VEGF Y 894 G>T DEL GEN NOS3

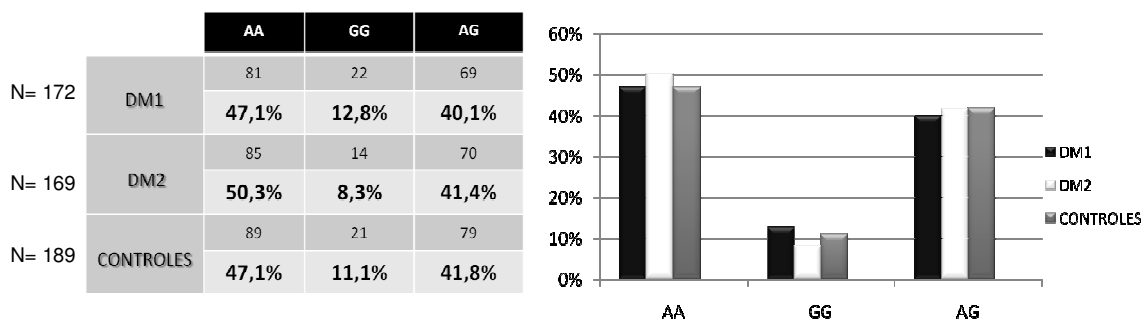
El estudio de haplotipos de los polimorfismos 594 G>T de EDN1, -2578 A>C del gen VEGF y G>T 894 del gen NOS3 no mostró diferencias entre los grupos de pacientes con DM1, pacientes con DM2 y los controles (Tabla 11)

Tabla 11. Frecuencia haplotípica de los polimorfismos estudiados de los genes EDN1, VEGF y NOS3 en las poblaciones control, pacientes con DM1 y pacientes con DM2.

HAPLOTIPO EDN1-VEGF-NOS3	FRECUENCIA CONTROLES	FRECUENCIA DM1	FRECUENCIA DM2
GAG	0,229	0, 226	0,251
GAT	0,150	0,135	0,109
GCG	0,258	0,285	0,244
GCT	0,138	0,186	0,169
TAG	0,082	0,069	0,060
TAT	0,039	0,026	0,075
,TCG	0,072	0,088	0,052
TCT	0,027	0,020	0,035

1.8 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO 49 A>G DEL GEN CTLA4 (rs231775)

El estudio de la distribución de genotipos del polimorfismo 49 A>G del gen CTLA4 no mostró diferencias significativas entre las poblaciones incluidas en nuestro trabajo (Figura 59).



DM1 vs CONTROLES $p= 0,871$

DM2 vs CONTROLES $p= 0,631$

DM1 vs DM2 $p= 0,396$

Figura 59. Distribución de genotipos del polimorfismo 49 A>G de CTLA4 en las poblaciones de pacientes con DM1, pacientes con DM2 y controles.

El estudio de la agrupación de genotipos tampoco mostró diferencias significativas entre las poblaciones de los pacientes con DM1, los pacientes con DM2 y los controles (Figura 60).

	AA+AG	GG
DM1	150 87,2%	22 12,8%
DM2	155 91,7%	14 8,3%
CONTROLES	168 88,9%	21 11,9%

	GG+AG	AA
DM1	91 52,9%	81 47,1%
DM2	84 49,7%	85 50,3%
CONTROLES	100 52,9%	89 47,1%

DM1 vs CONTROLES $p= 0,623$

DM2 vs CONTROLES $p= 0,369$

DM1 vs DM2 $p= 0,179$

DM1 vs CONTROLES $p= 1$

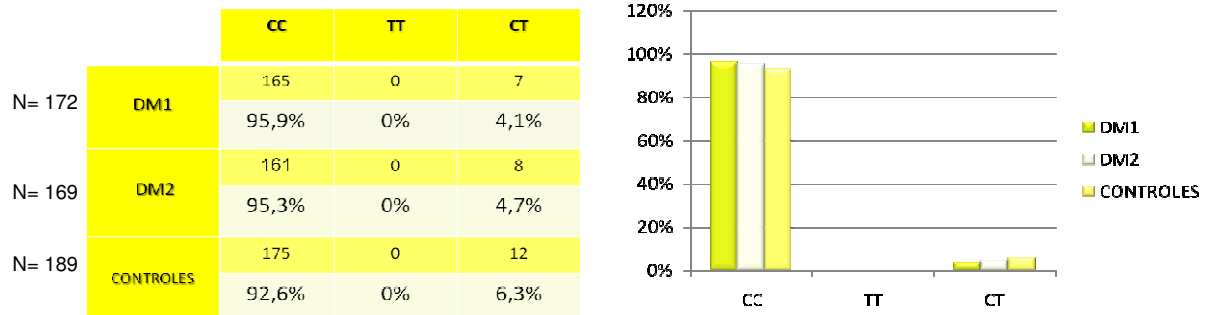
DM2 vs CONTROLES $p= 0,545$

DM1 vs DM2 $p= 0,554$

Figura 60. Distribución por agrupación de genotipos del polimorfismo 49 A>G del gen CTLA4

1.9 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO 293 C>T DEL GEN HNF1A (rs1800574)

El estudio del polimorfismo 293 C>T del gen HNF1A no mostró diferencias significativas entre las poblaciones de diabéticos tipo 1, diabéticos tipo 2 y controles (Figura 61).



DM1 vs CONTROLES $p= 0,355$

DM2 vs CONTROLES $p= 0,491$

DM1 vs DM2 $p= 0,765$

Figura 61. Distribución de genotipos del polimorfismo 293 C>T del gen HNF1A en las poblaciones de pacientes con DM1, pacientes con DM2 y controles.

El estudio por agrupación de genotipos del polimorfismo 293 C>T del gen HNF1A no pudo realizarse debido a la ausencia de portadores del genotipo TT en los tres grupos de población sometidos a estudio.

2. ESTUDIO GENÉTICO DE DIABETES MODY

2.1 ESTUDIO DEL GEN HNF1A

El estudio del gen HNF1A en 55 pacientes con diagnóstico de sospecha de diabetes MODY nos permitió caracterizar cuatro mutaciones patogénicas, dos de las cuales se describen por primera vez en este trabajo (Tabla 12).

Tabla 12. Mutaciones encontradas en el gen HNF1 α en la población estudiada. En rojo las mutaciones no descritas en la literatura.

MUTACION	EXON	TIPO DE CAMBIO	NºPACIENTES
E48K	1	MISSENSE	2
T137SfsX17	2	DELECIÓN	1
K205N	3	MISSENSE	1
P291PfsX25	4	INSERCIÓN	3

La mutación p.E48K se debe al cambio de una guanina por una adenina en el nucleótido 142 (c. 142 G>A) y fue descrita por primera vez en 1998 (Moller et al., 1998). Esta mutación se localiza en el exón 1, al final del dominio de dimerización de la proteína. En nuestra población, este cambio fue encontrado en dos pacientes no relacionados de los que no pudimos disponer de los árboles genealógicos.

La mutación p. P291PfsX25, descrita en 1996 (Yamagata et al., 1996b), tiene lugar por la inserción de una citosina en el nucleótido 873 (c. 873 insC), dentro del exón 4, lo que provoca un cambio en la fase de lectura de la proteína y la formación de un codón de stop prematuro en el codón 316, generándose una proteína truncada que pierde todo el dominio de transactivación y que actuaría como una isoforma dominante negativa (Yamagata et al., 1996b). En nuestra población hemos localizado esta mutación en tres pacientes no relacionados entre sí (Figura 62). Únicamente hemos estudiado a dos familiares de uno de los pacientes índice (madre y hermana en la familia b).

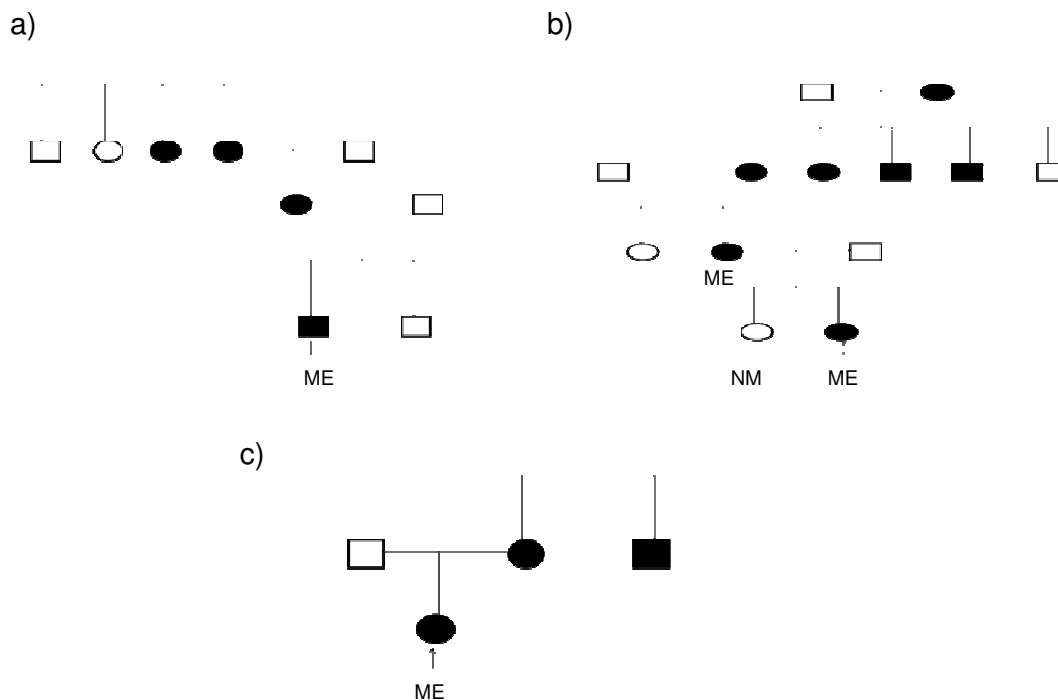


Figura 62. Árboles genealógicos de las tres familias donde se encontró la mutación p.P291PfsX25. (● / ■ = diabéticos; ↑ = caso índice; ME= mutación encontrada; NM= no mutación).

La mutación p.T137SfsX17 ocurre por la delección de 7 nucleótidos en el exón 2 (c.432 delACTGGCC), produciéndose un cambio en la fase de lectura de la proteína y la formación de un codón de stop en la posición 154, generándose una proteína truncada que pierde regiones fundamentales para el funcionamiento de la misma. Dada la magnitud de los cambios que produce esta mutación no hemos considerado necesario realizar estudios poblacionales ni estudios bioinformáticos de predicción. Así mismo, no se pudo realizar un modelo de predicción de la estructura proteica debido a que la proteína generada como consecuencia de esta mutación es demasiado pequeña. La mutación p. T137SfsX17 no está descrita en la literatura y la hemos localizado en un paciente con antecedentes de diabetes en la familia no disponiendo del material para realizar el estudio de segregación completo (Figura 63).

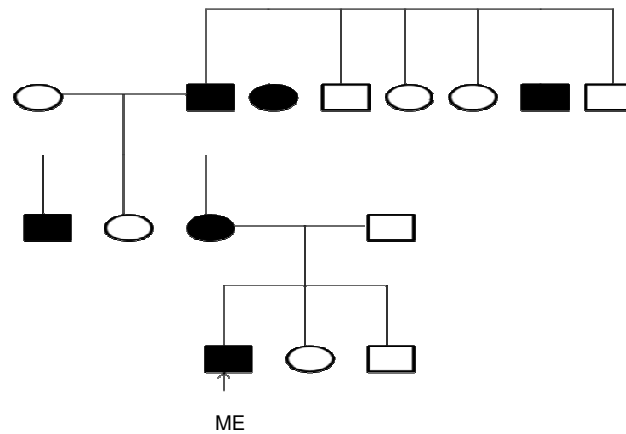


Figura 63. Árbol genealógico de la familia afectada de la mutación p. T137fs154X (● / ■ = diabéticos; ↑ = caso índice; ME= mutación encontrada).

La mutación c.615 C>G es producida por el cambio de guanina por citosina en el nucleótido 615, dentro del exón 3, y da lugar a un cambio de lisina por asparragina en el codón 205 de la proteína (p.K205N), situado dentro del dominio de unión al DNA. Esta mutación fue localizada en una única paciente y se describe por primera vez en nuestro estudio, aunque hay un estudio previo que muestra un cambio en el mismo codón asociado a diabetes MODY (Iwasaki et al., 1997). (Figura 64).

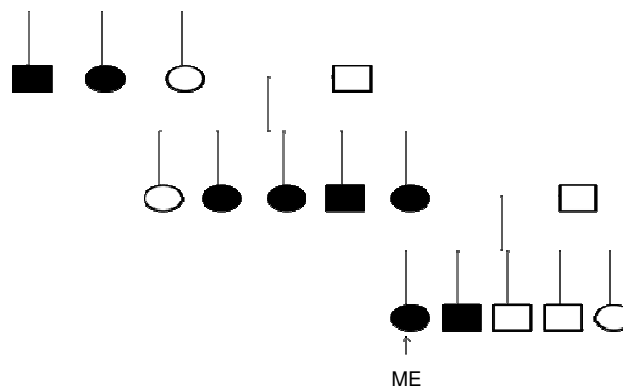


Figura 64. Árbol genealógico de la familia de la paciente con la mutación p.K205N (● / ■ = diabéticos; ↑ = caso índice; ME= mutación encontrada).

Dado que la mutación p. K205N se trataba de un cambio de aminoácido dentro del dominio de unión al DNA que se describía por primera vez, se

decidió hacer un estudio más en profundidad para comprobar el verdadero efecto de esta mutación sobre la proteína. En primer lugar, se realizó un estudio poblacional en 100 controles sanos para descartar que esta mutación pudiera ser una variante polimórfica presente en la población general. Esta variante no se encontró en ninguno de los controles analizados (Figura 65).

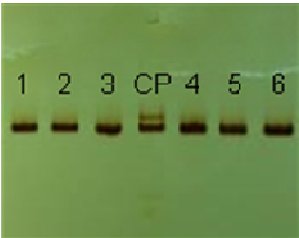


Figura 65. Muestra del estudio realizado sobre 100 controles sanos para la búsqueda de la mutación p.K205N (CP: Muestra del paciente con la mutación K205N).

El análisis del grado de conservación de este aminoácido entre diferentes especies, realizado mediante el programa ClustalW, mostró que la lisina del codón 205, al igual que los aminoácidos adyacentes, se encontraba muy conservada en todas las especies analizadas (Figura 66).

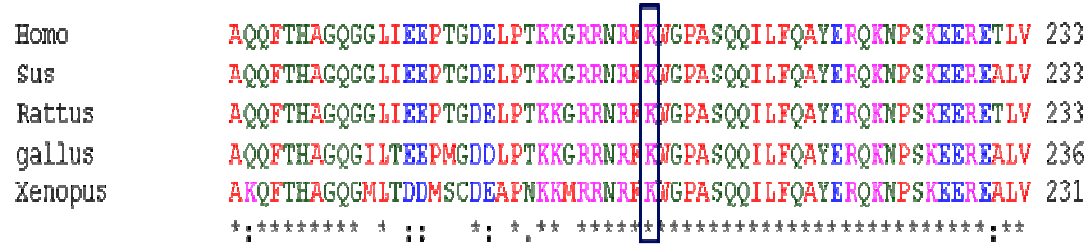


Figura 66. Comparación de la secuencia de proteína HNF1α en la región adyacente al cambio en la posición 205 entre el hombre, cerdo, rata, gallo y *Xenopus*. Se observa que la lisina de la posición 205 se encuentra conservada en todas las especies estudiadas.

Posteriormente, se llevó a cabo un estudio *in silico*, utilizando 3 programas bioinformáticos de predicción de patogenicidad de mutaciones (PMUT, SIFT, POLYPHEN), y excepto el programa PMUT, SIFT y POLYPHEN mostraron que el cambio de lisina por asparragina en esta posición puede considerarse patogénica y puede afectar a la función de la proteína (Tabla 13).

Tabla 13. Resultado de la predicción de los programas bioinformáticos sobre el cambio de lisina por asparragina en la posición 205.

POLYPHEN	Probablemente patogénica
PMUT	Neutral
SIFT	Patogénico (afecta a la función de la proteína)

2.1.1 CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS ISOFORMAS DEL GEN HNF1A

Además de la proteína HNF1A con la mutación p.K205N, hemos estudiado dos isoformas encontradas de forma casual en las células HepG2 durante el proceso de clonación de la isoforma completa, y que se generan por un procesamiento alternativo de sus exones (Figura 67).

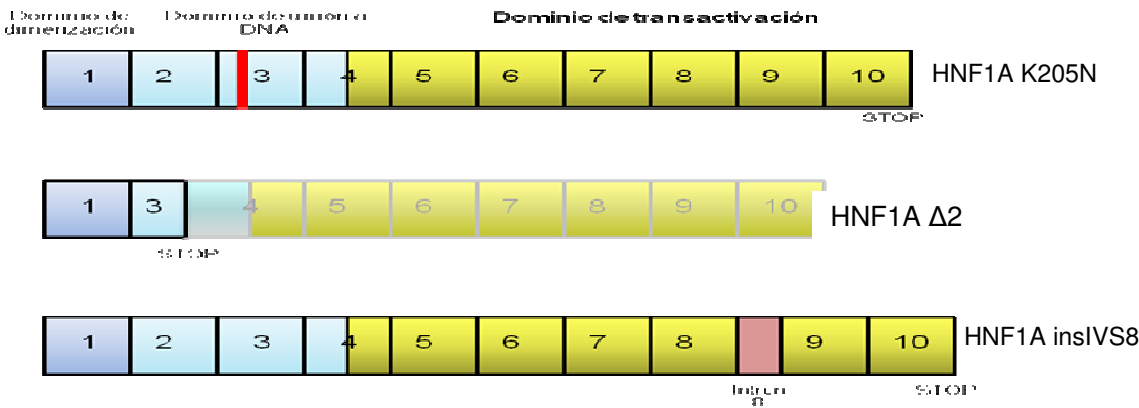


Figura 67. Esquema de los cDNAs de HNF1A utilizados para el ensayo de luciferasa. El primero contiene la mutación p.K205N, el segundo de ellos, HNF1A Δ2, pierde el exón 2 lo que se generaría una proteína truncada que pierde casi todos los dominios funcionales de la proteína. El tercer cDNA analizado, HNF1A insIVS8, no procesa el intrón 8, introduciéndose 31 aminoácidos dentro del dominio de transactivación de la proteína, sin modificar la fase de lectura.

La primera de las isoformas, denominada HNF1A Δ2, sufre un procesamiento alternativo del exón 2, de forma que pierde este exón y, a su vez, la fase de lectura de la proteína, generandose un codón de stop prematuro en la posición 119, lo que genera una proteína que pierde el dominio de unión a DNA y el dominio de transactivación completos (Figura 68).

```

Hnf1      MVSKLSQLQTELLAALLESGLSKEALIQALGEPGYLLAGEGPLKGESCGGGRGELAEL 60
hnf12     MVSKLSQLQTELLAALLESGLSKEALIQALGEPGYLLAGEGPLKGESCGGGRGELAEL 60
          *****

Hnf1      PNGLGETRGSEDETDDGEDFTPPILKELENLSPEEAHQKAVVETLLQEDPWRVAKMVK 120
hnf12     PNGLGETRGSEDETDDGEDFTPPILKELENLSPEEAHQKAVVETLLQVHPCRAGRAD- 119
          *****

Hnf1      SYLQQHNIPQREVVDTTGLNQSHLSQHLNKGTPMKTKRAALYTWYVRKQREVAQQFTHA 180
hnf12     -----

hnf1      GGGGLIEEPTGDELPTKKGRNRFKWGPASQQILFQAYERQKNPSKEERETLVEECNRAE 240
hnf12     -----

```

Figura 68. Comparación de la proteína HNF1A silvestre y la isoforma carente del exón 2. La isoformas truncada solo comparte los 109 primeros aminoácidos con la proteína *wild type*. HNF1: *wild type* HNF12: isoforma $\Delta 2$.

La otra isoforma encontrada, denominada HNF1insIVS8, no procesa el intrón 8, por lo que se integran 31 aminoácidos dentro del dominio de transactivación de la proteína, sin perder la fase de lectura. El modelo obtenido con el programa de predicción de estructuras proteicas 3D-Jigsaw, mostró que la inserción de estos 31 aminoácidos modificaría la conformación de la proteína (Figura 69).

a)

```

hnf1      QSHVTQSPFNATMAQLQSPHALYSHKPEVAJYHTGGLPOTMITTDITNLSALASLTPTK 540
hnf1a     QSHVTQSPFNATMAQLQSPHALYSHKPEVAJYHTGGLPOTHLITDITNLSALASLTPTK 540
          *****

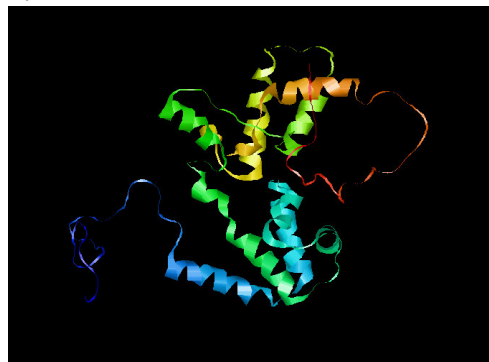
hnf1      QYQYRSFPAGFPPLACDRAPHPHIPRAQEAAALPQVFTSDTEASSSSQLMTPASQATTLHVPS 569
hnf1a     QYQYRSFPAGFPPLACDRAPHPHIPRAQEAAALPQVFTSDTEASSSSQLMTPASQATTLHVPS 600
          *****

hnf1      QDPAGIQHLQPAHFLSASPTVSSSSLYLYQSSDSNGQSHLLFSNHSVIETFISTQMASS 629
hnf1a     QDPAGIQHLQPAHFLSASPTVSSSSLYLYQSSDSNGQSHLLFSNHSVIETFISTQMASS 660
          *****

hnf1      SQ- 631
hnf1a     SQX 663
          ==

```

b)



c)



Figura 69. 1) Comparación de las secuencias de proteína de la isoforma silvestre (hnf1) y HNF1A intrón 8 (hnf1a), en la que se observa que la isoforma HNF1A ins IVS8 presenta la inserción de 31 aminoácidos sin modificar la fase de lectura. 2) Modelo de la estructura tridimensional de HNF1A silvestre obtenida con el programa 3D-Jigsaw y RasMol 3) Modelo de

la estructura tridimensional de HNF1A con la inserción del intrón 8 obtenida con el programa 3D-Jigsaw y RasMol, en que se aprecia un cambio en la conformación de la misma con respecto a la proteína silvestre.

2.1.2 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA LUCIFERASA

El estudio de la actividad de la luciferasa fue realizado en las líneas celulares, COS-1 y HepG2. La línea celular COS-1 representa un sistema neutro en el cual no hay expresión de ninguno de estos genes, mientras que HepG2 encarna un sistema más real, ya que tanto HNF1A como GLUT2 se expresan en estas células.

Los resultados obtenidos mostraron que tanto la proteína con la mutación p.K205N como la isoforma HNF1A $\Delta 2$ presentaban una menor actividad en comparación con la proteína silvestre en ambas líneas celulares. Esta diferencia en la actividad llega a ser significativa en la línea celular HepG2 en la cual se produce una reducción de la actividad de hasta el 70 % en el caso de la mutación p.K205N y del 77% en el caso de la proteína truncada (Figura 70). Por el contrario, la isoforma que contiene el intrón 8 presentaba una actividad mayor que la proteína silvestre en ambas líneas celulares (Figura 70).

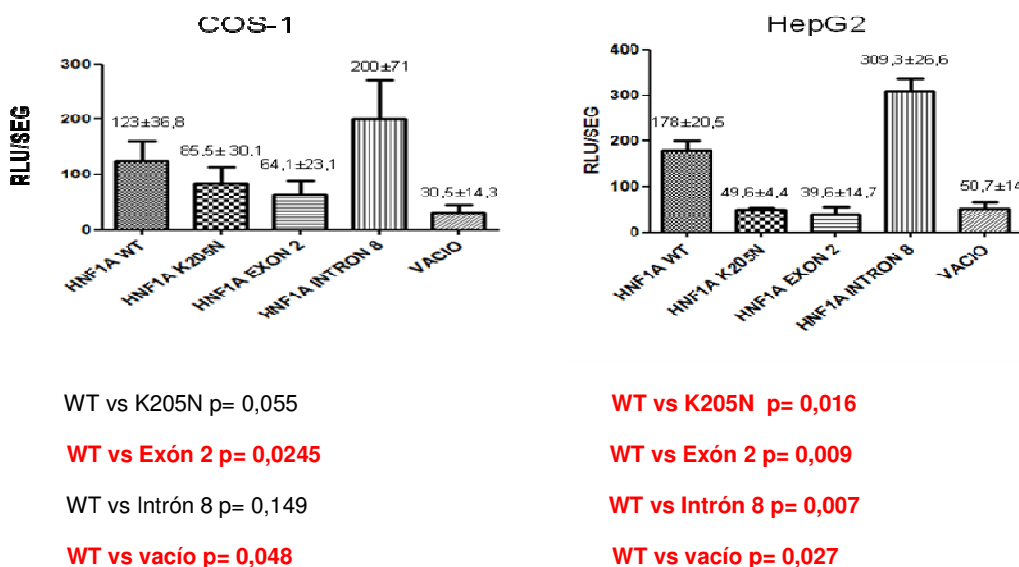


Figura 70. Representación de los valores normalizados de actividad luciferasa en cada una de las variantes de HNF1A estudiadas, en las líneas celulares COS-1 y HepG2.

Además de las mutaciones patogénicas, también encontramos varios polimorfismos dentro del gen HNF1A, algunos de ellos no descritos anteriormente (Tabla 14). Muchos de los polimorfismos se localizan dentro de los exones y se trata de cambios silenciosos que no modifican el aminoácido. También hemos encontrado polimorfismos de cambio de sentido, como I27L, A98V y S487N, ya descritos previamente (Winckler et al., 2005). En nuestro estudio la frecuencia de los polimorfismos I27L y S487N fue alta, ya que se encontró en el 51% y el 38% de los casos respectivamente, mientras que el polimorfismo A98V se encontró con una frecuencia mucho menor (3,6%). Respecto a los polimorfismos intrónicos, todos ellos se encuentran alejados de las secuencias canónicas de procesamiento de los exones y algunos de ellos, como el polimorfismo IVS7 +7, se encuentran de forma frecuente en la población (Yamagata et al., 1996b).

Tabla 14. Polimorfismos encontrados en el gen HNF1A. Los cambios marcados en rojo corresponden a cambios no descritos previamente.

INTRÓN/EXÓN	POSICION	CAMBIO	CAMBIO EN LA PROTEÍNA	Nº CASOS	FRECUENCIA
EXÓN 1	75	C>G	L17L	39	71%
EXÓN 1	103	A>C	I27L	28	51%
EXÓN 1	297	C>T	N91N	1	1,8%
EXÓN 1	317	C>T	A98V	2	3,6%
EXÓN 4	888	G>C	G288G	21	38,2%
INTRÓN 2	-41	G>A		2	3,6%
INTRÓN 3	-23	C>T		2	3,6%
EXÓN 7	1399	C>T	L459L	23	41,8%
EXÓN 7	1484	G>A	S487N	21	38,2%
INTRÓN 7	+7	G>A		22	40%
EXÓN 8	1588	G>A	T515T	12	21,8%
INTRÓN 8	-39	insCGTCTGC AC		1	1,8%
INTRÓN 9	+38	delTGCinsA		1	1,8%
INTRÓN 9	+44	C>T		1	1,8%
INTRÓN 10	-23	T>C		1	1,8%

Las características clínicas de los pacientes con mutaciones en HNF1A se describen en la tabla 15. Ninguno de ellos presenta fenómenos de autoinmunidad y, como se observa en la tabla, el índice de masa corporal medio es ligeramente alto ($25,8 \pm 6,4$). La edad media de inicio es de $21,6 \pm 5,03$, la glucemia basal en ayunas media es del $117,7 \text{ mg/dL} \pm 20,89$ y el porcentaje medio de hemoglobina glicada (Hb1c%) es de $6,83 \pm 1,03$. El tratamiento en la mayoría de los casos fue con insulina. Con respecto a la aparición de complicaciones, sólo disponemos de los datos de la primera paciente, que presenta retinopatía y nefropatía diabética.

Tabla 15. Características clínicas de los pacientes con mutaciones en HNF1A, en la que se incluyen el índice de masa corporal (IMC), glucemia basal en ayunas (Gluc.Ayunas en mg/dL), porcentaje de hemoglobina glicosilada (Hb1%c), la edad de inicio de la diabetes, tratamiento (TTO) y presencia de autoanticuerpos pancreáticos.

PACIENTE	IMC	GLUC. AYUNAS (mg/dL)	Hb1c%	EDAD INICIO	TRATAMIENTO	AUTOANTICUERPOS PANCREÁTICOS
1 (E48K)	34,55	?	8,20%	20	INSULINA	?
2 (E48K)	33,46	?	7,16%	23	INSULINA+ METFORMINA	?
3 (P291PfsX25)	23,03	119	7,40%	21	DIETA+ SULFONILUREAS	IA2: NEG GAD: NEG ICAs: NEG
4 (P291PfsX25)	21	120	5,40%	17	INSULINA	IA2: NEG GAD: NEG AAI: NEG
5 (P291PfsX25)	?	83	5,30%		?	
7 (T137SfsX17)	22,5	124	7%	16	INSULINA	IA2: 0,47u/ML GAD: 0,26 u/ML ICAs: 0,4%
8 (K205N)	20,4	140	5,83%	30	DIETA+ SULFONILUREAS	IA2: NEG GAD: <0,5 ICAs: NEG

2.2 ESTUDIO DEL GEN GCK

El análisis de mutaciones en el gen GCK fue realizado en 55 pacientes con sospecha de diabetes MODY y se encontraron tres mutaciones patogénicas en cinco de estos pacientes, dos de las cuales se describen por primera vez en nuestro trabajo (Tabla 16).

Tabla 16. Mutaciones encontradas en el gen GCK en la población estudiada. Las mutaciones que figuran en rojo se describen por primera vez.

MUTACION	EXON	TIPO DE CAMBIO	Nº PACIENTES
Q337X	8	NONSENSE	2
F316SfsX36	8	DELECIÓN	1
E256K	7	MISENSE	2

La mutación p. Q337X se produce por el cambio de citosina por timina en el nucleótido 1009 (c.1009 C>T), lo que origina un codón de stop en la posición 337(p.Q337X) de la proteína, generando una proteína truncada que pierde parte del dominio grande, que provoca un cambio de conformación de la proteína y la pérdida de su funcionalidad (Figura 71).

a)



b)

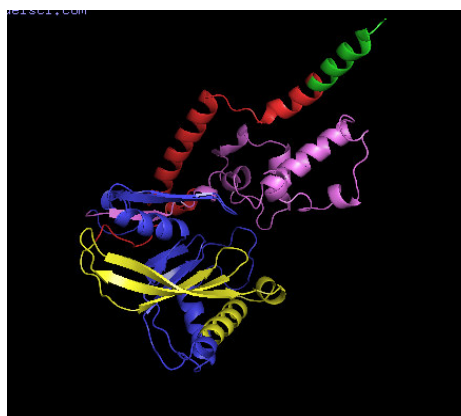


Figura 71. a) Modelo de la estructura tridimensional de GCK silvestre obtenida con el programa 3D-Jigsaw. b) Modelo de la estructura tridimensional de GCK con la mutación p.Q337X obtenida con el programa 3D-Jigsaw, en el cual se observa que la mutación genera una proteína truncada que pierde su conformación.

Esta mutación fue encontrada en dos familias diferentes y los miembros de estas familias que tenían esta mutación presentaban diabetes, por lo que la mutación se segrega con la enfermedad, aunque en una de las familias estudiadas, dos hermanos del caso índice no tienen la mutación y son diabéticos, lo que puede ser explicado por un fenómeno de fenocopia, frecuente en las familias con diabetes MODY (Malecki et al., 1999) (Figura 72).

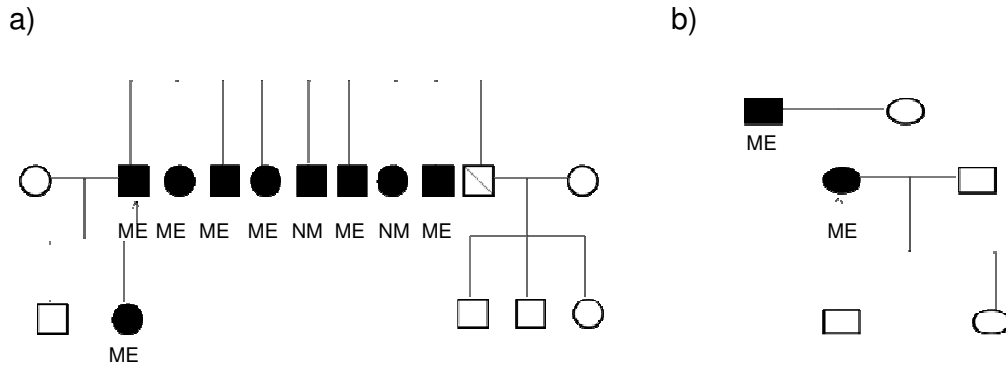
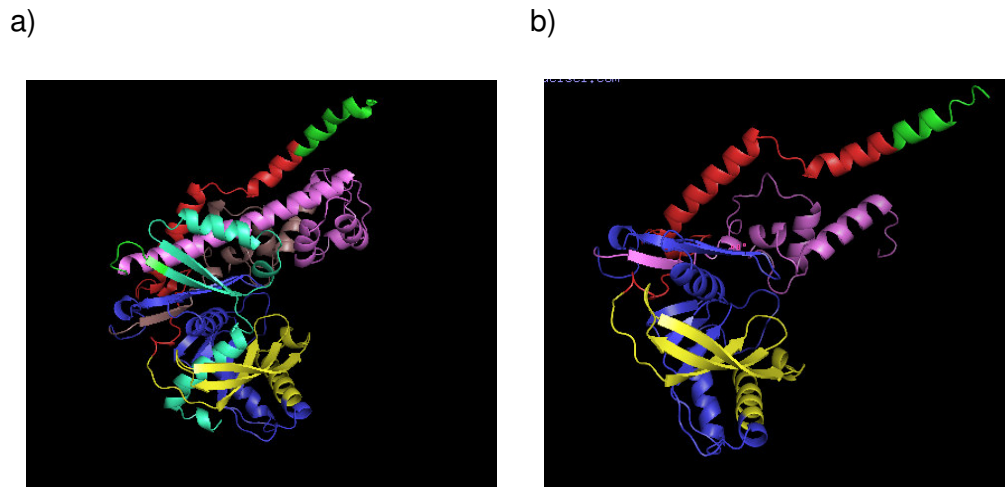


Figura 72. Árboles genealógicos de las dos familias donde se encontró la mutación Q337X en el gen GCK. (● / ■ = diabéticos; ↑ = caso índice; ME= mutación encontrada; NM= no mutación).

La mutación p.F316SfsX36 se produce por la delección de una timina en el nucleótido 1252 (c.1252 delT) dentro del exón 8, y tiene como consecuencia un cambio en el marco de lectura de la proteína y la aparición de un codón de stop prematuro en la posición 352, de forma que se pierde la parte final de la proteína, lo que modificaría la conformación de la proteína y causaría la pérdida de su función. El padre de la paciente también presentaba esta mutación (Figura 73).



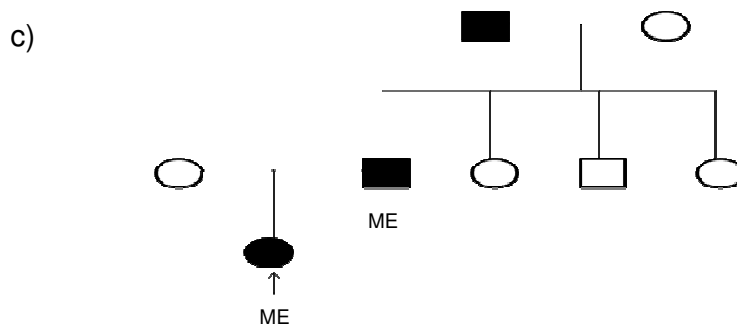
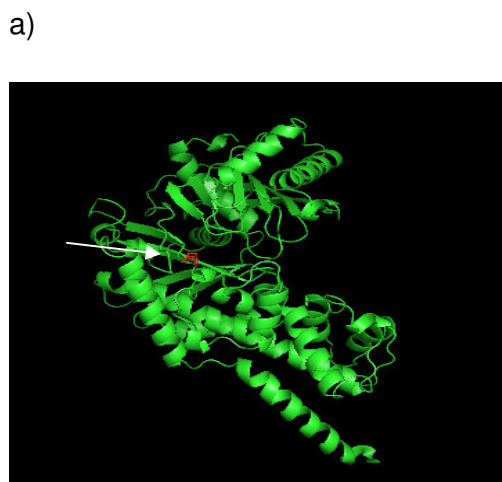


Figura 73. a) Modelo de la estructura tridimensional de la proteína GCK silvestre obtenida con el programa 3D-Jigsaw. b) Modelo de la estructura tridimensional de la proteína GCK con la mutación p.F316SfsX36, en el cual se observa que la esta mutación genera un cambio conformacional en la proteína en relación con la proteína silvestre. c) Árbol genealógico de la familia de la paciente con la mutación p.F316SfsX36 (● / ■ = diabéticos; ↑ = caso índice; ME= mutación encontrada).

La mutación p. E256K, descrita en 1992 (Gidh-Jain et al., 1993), se produce por la transición de una guanina por adenina en la posición 766 (c. 766 G>A). Los estudios bioquímicos realizados en la proteína mutante mostraron una pérdida de actividad del 75% con respecto a la proteína nativa ya que el residuo E256 es uno de lo que se une directamente a la glucosa (Gidh-Jain et al., 1993). Al igual que en los casos anteriores, la mutación está presente en los familiares diabéticos (Figura 74).



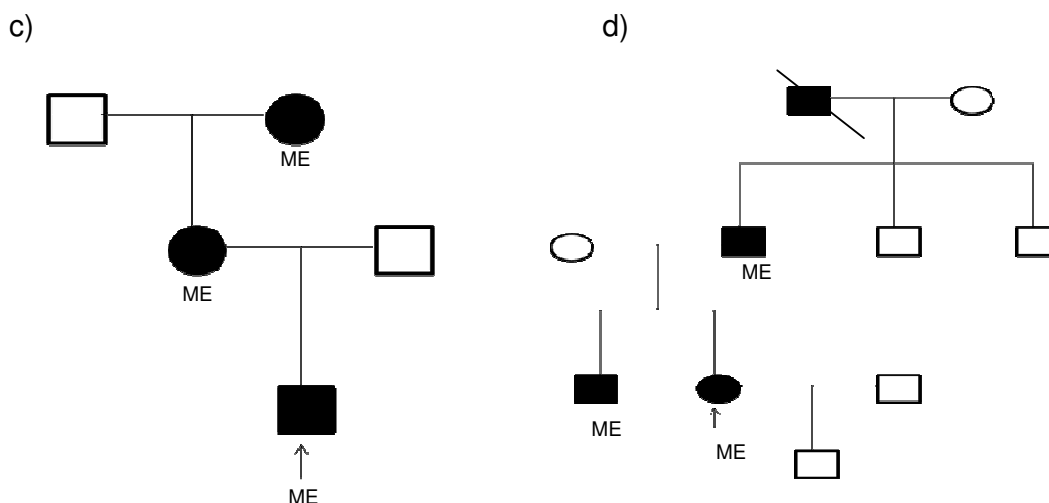


Figura 74. a) Modelo tridimensional de la estructura de la GCK silvestre. Señalado con una flecha el residuo E256 (en rojo). b) Modelo tridimensional de la estructura de la GCK con la mutación p.E256K, señalada con una flecha (en rojo el residuo mutado K256). c y d) Árboles genealógicos de las familias con la mutación p. E256K (● / ■ = diabéticos; ↑ = caso índice; ME= mutación encontrada).

Además de las mutaciones patogénicas, se han encontrado varios polimorfismos, todos ellos intrónicos, uno de los cuales se describe por primera vez en este trabajo (Tabla 17). Además, algunos de ellos como el cambio IVS9 +8 C>T se encuentran de forma frecuente en la población general (Stone et al., 1994). En nuestro estudio este polimorfismo se encontró en una frecuencia del 20%.

Tabla 17. Polimorfismos encontrados en los pacientes estudiados. El polimorfismo marcado en rojo no está descrito en la literatura

INTRON/EXON	POSICION	CAMBIO	Nº CASOS	FRECUENCIA
INTRÓN 5	-29	G>C	3	5,4%
INTRÓN 6	+38	C>T	4	7,2%
INTRÓN 9	+8	C>T	11	20%
INTRÓN 9	+48	G>A	1	1,8%

Las características clínicas de los pacientes se muestran en la tabla 16. Los pacientes con mutaciones en GCK presentan las características típicas de la diabetes MODY2, con una hiperglucemia media de $114,3 \pm 8,08$ mg/dL y ausencia de complicaciones. La edad de inicio media fue de

20,6±17,37, el porcentaje de hemoglobina glicada medio de 5,94±0,39% y en la mayoría de los casos el tratamiento consistió únicamente en dieta. Además, no presentaban anticuerpos pancreáticos y el índice de masa corporal medio fue normal (21,69±1,58) (Tabla 18).

Tabla 18. Tabla de las características clínicas de los pacientes con diabetes MODY 2, en las que se incluye el índice de masa corporal (IMC), la glucemia basal en ayunas (Gluc. Ayunas), el porcentaje de hemoglobina glicosilada (Hb1c%), la edad de aparición y el tratamiento (TTO).

PACIENTE	IMC	GLUC. AYUNAS (mg/dL)	Hb1c%	EDAD INICIO	TRATAMIENTO	AUTOANTICUERPOS PANCREATICOS
1 (Q337X)	23,38	?	6,30%	44	DIETA	?
2 (Q337X)	20,6	107	6,40%	34	SULFONILUREAS +METFORMINA	?
3(F316SfsX36)	21,5	123	5,50%	10	BIGUANIDAS	GAD: 1,02 u/ml ICAs: NEG AAI: 6,4%
4 (E256K)	19,78	?	5,70%	4	DIETA	?
5 (E256K)	23,19	113	5,80%	11	DIETA	IA2: NEG GAD: NEG

2.3 ESTUDIO DEL GEN HNF4A

El análisis del gen HNF4A en 55 pacientes con sospecha de diabetes MODY, mostró una mutación patogénica únicamente en un paciente, que se describe por primera vez en nuestro estudio (Tabla 19).

Tabla 19. Características de la mutación encontrada en HNF4A en la población estudiada.

MUTACION	EXÓN	TIPO DE CAMBIO	NUMERO DE PACIENTES
R131X	4	NONSENSE	1

El cambio se corresponde con un cambio de citosina por timina en el nucleótido 418 (c.418 C>T), en el exón 4 y provoca la aparición de un codón de stop prematuro en el codón 131 de la proteína (p.R131X). La presencia de un codón de stop en esta posición provoca la pérdida de regiones fundamentales para el funcionamiento de la proteína. Lamentablemente, no disponemos de

datos clínicos del paciente ni de su árbol genealógico, de manera que no se ha podido profundizar más en el estudio de la misma.

Por otro lado, se han encontrado cinco polimorfismos en este gen, dos exónicos y tres intrónicos, dos de los cuales no están descritos en la literatura (Tabla 20). El polimorfismo T130I ha sido descrito previamente en la literatura (Zhu et al., 2003) y su frecuencia en la población general es baja (6,7% HapMap-CEU). En nuestra población la frecuencia de este polimorfismo es del 3,6%. Por otro lado, los polimorfismos intrónicos se encuentran alejados de los sitios de procesamiento de los intrones, y en el caso del polimorfismo que afecta a la posición -5 del intrón 2, es un polimorfismo frecuente en la población general (Pruhova et al., 2003). En nuestro estudio fue encontrado en 11 pacientes. Sin embargo, el polimorfismo localizado en la posición +6 del intrón 4, no descrito previamente, se encontró únicamente en un paciente. Debido a que se halla próximo a los sitios implicados en el procesamiento del exón, decidimos realizar un estudio poblacional sobre 100 controles, en ninguno de los cuales se encontró este cambio. Sin embargo, al no disponer de RNA del paciente con este cambio, no se ha podido comprobar el efecto real sobre el procesamiento del RNA. El cambio +32 del intrón 1, al estar más alejado de los sitios de procesamiento, no parece ser determinante en el procesamiento y maduración del RNA.

Tabla 20. Polimorfismos hallados en el gen HNF4A. El cambio marcado en rojo se corresponde con un cambio no descrito en la literatura.

INTRÓN/EXÓN	POSICION	CAMBIO	CAMBIO EN LA PROTEÍNA	Nº CASOS	FRECUENCIA
INTRÓN 1	+32	G>A		3	5,4%
INTRÓN 2	-5	C>T		11	20%
EXÓN 2	291	C>T	A67A	3	5,4%
EXÓN 4	506	C>T	T130I	2	3,6%
INTRÓN 4	+6	G>A		1	1,8%

2.3 RESUMEN DE RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LOS GENES HNF1A, GCK Y HNF4A

El estudio de diabetes MODY en un total de 55 pacientes mostró que 13 de estos pacientes presentaban mutaciones patogénicas, 5 en GCK, 7 en HNF1A y 1 en HNF4A (Tabla 21), lo que significa que el 9,1% de los pacientes presenta mutación en GCK, el 12,7% en HNF1A y el 1,8% en HNF4A, de manera que el tipo de diabetes MODY más frecuente en nuestro estudio es la diabetes MODY 3.

Tabla 21. Tabla resumen de las mutaciones en los genes GCK, HNF1A y HNF4A encontradas en la población incluida en nuestro estudio

GEN	GCK	GCK	GCK	HNF1A	HNF1A	HNF1A	HNF1A	HNF4A
Mutación	Q337X	F316SfsX36	E254K	K205N	E48K	T137SfsX17	P291SfsX25	R131X
Exón	8	8	7	3	1	2	4	4
Tipo de cambio	NONSENSE	DELECIÓN	MISENSE	MISENSE	MISENSE	DELECIÓN	INSERCIÓN	NONSENSE
Nº pacientes	2	1	2	1	2	1	3	1

5. DISCUSSION

1. CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES ALÉLICAS DE SUSCEPTIBILIDAD AL DESARROLLO DE DIABETES

La diabetes es una enfermedad en expansión que afecta en la actualidad a unos 200 millones de personas en todo el mundo y se estima que en el año 2025 supere la cifra de los 320 millones de personas, lo que supone un elevado gasto sanitario. Conocer las variantes genéticas que predisponen al desarrollo de la diabetes puede ser de gran utilidad, tanto para un mejor conocimiento de los procesos patológicos que desencadenan la enfermedad y el diseño de nuevas dianas terapéuticas, como para poder prevenir la enfermedad en aquellas personas con mayor susceptibilidad.

Tanto la DM1 como la DM2 son enfermedades poligénicas en las que intervienen un gran número de factores y, en muchos casos, la importancia de cada una de las variantes genéticas de susceptibilidad dependerá del tipo de población estudiada.

1.1 ESTUDIO DE LAS VARIANTES ALÉLICAS DE LAS CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS

Las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6, TNF- α y CD40 desempeñan un papel fundamental en el desarrollo tanto de la DM1 como de la DM2. En el caso de la DM1, intervienen tanto en la activación del sistema inmune, como en los mecanismos implicados en la apoptosis de las células β , mientras que la sobreproducción de las mismas por el tejido adiposo puede favorecer el desarrollo de la resistencia a la insulina y la DM2 (Cnop et al. 2005; Sethi y Hotamisligil, 1999).

El gen IL1B presenta varios polimorfismos de relevancia biológica. En nuestro estudio nos hemos centrado en el polimorfismo -511 C>T (rs16944) situado en la zona promotora del gen. Estudios previos muestran la relación de este polimorfismo con susceptibilidad a nefropatía en diabéticos tipo 2, debido a que los portadores del alelo IL1B2 eran más abundantes entre los

pacientes con fallo renal que en los controles (Lee et al., 2004c). Por otro lado, también se ha descrito relación de este polimorfismo con el metabolismo de la glucosa, de manera que el alelo C, englobado dentro de un haplotipo que contiene los polimorfismos 315 C>T (rs114634) e intrón 3 A>G (rs391735) de este gen, se asocia a mayores niveles de glucosa y mayor resistencia a insulina (Luotola et al., 2009); sin embargo, no hay trabajos previos que muestren asociación de este polimorfismo de forma individual con susceptibilidad al desarrollo de DM1 o DM2. En nuestro estudio, no encontramos evidencias de asociación de este polimorfismo con predisposición al desarrollo de diabetes (Figuras 35 y 36), lo que sugiere que esta variante no puede emplearse como marcador de susceptibilidad para el desarrollo de diabetes.

En relación con el polimorfismo -174 G>C (rs1800795) del gen IL6, los estudios sobre su influencia en la susceptibilidad a diabetes muestran resultados contradictorios. Así, se ha sugerido que los pacientes portadores del genotipo CC presentan una edad de aparición de la diabetes tipo 1 mucho más temprana que los heterocigotos o los homocigotos GG (Kristiansen et al., 2003), mientras que el alelo G se asocia a susceptibilidad a síndrome metabólico en sujetos tolerantes a la glucosa, así como a susceptibilidad a DM2 en la mayoría de los estudios (Kristiansen y Mandrup- Poulsen, 2005). Además, un estudio reciente muestra que los diabéticos tipo 1 portadores del genotipo GG podrían ser menos susceptibles al desarrollo de retinopatía y nefropatía (Mysliwska et al., 2009). En la población estudiada en nuestro trabajo, no hemos encontrado evidencias de asociación entre este polimorfismo y la susceptibilidad al desarrollo de DM1 y de DM2 (Figuras 37 y 38). Este resultado difiere del obtenido en un estudio previo realizado sobre población española en el año 2003, en el que el genotipo GG se asoció a predisposición al desarrollo de DM2 (Vozarova et al. 2003). Sin embargo, al igual que en nuestro trabajo, también existen estudios en los que tampoco encuentran asociación de este polimorfismo con el desarrollo de diabetes (Hamid et al. 2005). La discrepancia encontrada entre todos estos estudios nos hacen pensar que la influencia del polimorfismo -174 G>C del gen IL6 sobre la

predisposición al desarrollo de diabetes puede variar dependiendo del tipo de población estudiada en cada caso.

La variante -1C>T (rs1883832) del gen CD40 se localiza en la secuencia conservada Kozack y estudios funcionales sugieren que el genotipo TT reduce hasta en un 39% la expresión de CD40 (Jacobson et al., 2005). El alelo C se relaciona con susceptibilidad a síndrome coronario agudo y con pérdida de masa ósea en mujeres postmenopausicas (Pineda et al., 2008; Yan et al. 2010) pero no hay estudios que relacionen este polimorfismo con susceptibilidad al desarrollo de diabetes. En nuestro trabajo no hemos observado asociación de este polimorfismo con susceptibilidad al desarrollo de DM1 y de DM2 (Figuras 41 y 42), lo que nos hace pensar que este polimorfismo no parece determinante para la predisposición al desarrollo de diabetes en esta población.

El polimorfismo -238 (rs361525) del gen TNFA supone el cambio de una G por A dentro de una región putativa Ybox, en la que se encuentra un sitio de represión de la transcripción (D'Alfonso y Richiardi, 1994). Los estudios sobre la influencia de este polimorfismo en la susceptibilidad a DM1 y DM2 son numerosos y los resultados varían. En el caso de la DM1, tanto este polimorfismo como otro situado también en la región promotora (-308 A>G rs1800629), se encuentran en desequilibrio de ligamiento con algunos haplotipos de alto riesgo del sistema HLA (Noble et al., 2006); por lo tanto, el riesgo que confiere a los portadores del genotipo AA puede estar asociado con tener uno de los haplotipos altamente susceptibles. Con respecto a la DM2, existen datos contradictorios sobre el efecto de este polimorfismo y su relación con la resistencia a la insulina; se piensa que este polimorfismo puede estar más relacionado con desordenes metabólicos que con la propia diabetes (Feng et al., 2009).

En la población estudiada por nosotros, encontramos que la frecuencia de los genotipos AA y AG de esta variante era significativamente mayor en los grupos de pacientes con DM1 y pacientes con DM2 que en la población control (Figura 39); además, el alelo A presentaba una frecuencia significativamente mayor en ambas poblaciones de diabéticos con relación a la

población control (Figura 40), lo que sugiere que la presencia de este alelo puede contribuir a la susceptibilidad al desarrollo de diabetes, aunque el riesgo que conferiría esta variante es bajo ($OR = 0,313$ ($0,180-0,543$) en DM1 y $OR = 0,487$ ($0,273-0,867$) en DM2). La contradicción entre los resultados obtenidos en los diferentes trabajos se debe probablemente a la diferente composición genética de las poblaciones estudiadas (Feng et al., 2009). El alelo A, que se ha relacionado con mayores niveles de transcripción de $TNF-\alpha$ (Baylay et al., 2001; D'Alfonso y Richiardi, 1994), podría influir en los mecanismos fisiopatológicos de los dos tipos de diabetes. En relación con la DM1, $TNF-\alpha$ es producido por linfocitos T $CD4^+$ y macrófagos durante la invasión de estas células a los islotes pancreáticos y participa en la apoptosis de las células β (Lee et al., 2004b), por lo que es posible que una mayor producción de esta citoquina, debida a la presencia de este alelo, pueda favorecer y acelerar los procesos de muerte celular en este tejido. Además, el alelo A se encuentra en desequilibrio de ligamiento con los haplotipos HLA de alto riesgo para la diabetes (Noble et al., 2006), por lo que la presencia de este alelo también puede ser un indicador de la presencia de estos haplotipos y, por tanto, un marcador de riesgo para el desarrollo de DM1 en la población objeto de nuestro estudio.

En el caso de la DM2, una mayor producción de $TNF-\alpha$ por parte de los portadores del alelo A de este polimorfismo se ha asociado con un incremento de la resistencia a la insulina (Valenti et al., 2005). Por otra parte, hay estudios que sugieren que una activación crónica del sistema inmune produce un descenso en la sensibilidad de la insulina (Pickup, 2004). Por tanto, es posible que variaciones en la concentración de citoquinas debida a variantes génicas pueden estar asociadas a estos bajos niveles de inflamación y que el alelo A de este polimorfismo pueda influir sobre los niveles de $TNF-\alpha$, y esto, a su vez, pueda influir en la expresión de otras citoquinas como IL-6, y, de esta manera, contribuir a los procesos inflamatorios en estos pacientes, aumentando la probabilidad de desarrollar diabetes.

Además, se observan diferencias entre los dos grupos de pacientes con diabetes, de manera que en la población estudiada por nosotros, el genotipo AA predispondría al desarrollo de DM1, mientras que el genotipo

AG conferiría susceptibilidad al desarrollo de DM2. Serán necesarios más estudios que determinen la influencia de cada uno de estos genotipos sobre la fisiopatología de ambas entidades

El estudio de haplotipos de los polimorfismos -511 C>T del gen IL-1B, -1 C>T del gen CD40, -174 G>C del gen IL-6, y -238 A>G del gen TNF- α mostró que la presencia conjunta del alelo C del polimorfismo de IL-1B, el alelo C de la variante del gen CD40, el alelo G del polimorfismo del gen IL-6 y el alelo A del polimorfismo del gen TNFA (CCGA) se asocia a predisposición al desarrollo de diabetes tipo 1 en la población estudiada, aumentando hasta cuatro veces el riesgo de desarrollar la enfermedad (Tabla 6). Todos estos alelos de forma individual se encuentran en mayor porcentaje en la población de pacientes con DM1 con relación a los controles (Figuras 36, 38, 40, 42) por lo que, aunque individualmente no presenten asociación con susceptibilidad al desarrollo de DM1, excepto en el caso de TNF- α , en su conjunto sí pueden contribuir al desarrollo de la diabetes. El mecanismo por el cual este haplotipo puede contribuir al desarrollo de DM1 es desconocido, pero es posible que se produzca a través de una sobreactivación de las células del sistema inmne implicadas en la patología de esta enfermedad, lo que favorecería la destrucción de las células productoras de insulina. Además, este hallazgo refuerza la implicación de TNF- α en la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad dado que el haplotipo se configura con genes localizados en diferentes cromosomas. Por el contrario, el haplotipo compuesto por los alelos CTCG de los genes IL1B, CD40, IL6 y TNFA respectivamente, confiere protección frente a DM1 en la población objeto de nuestro trabajo (OR= 0,437 (0,21-0,90) (Tabla 7). El alelo T de la variante de CD40, así como el alelo C del polimorfismo de IL6 y el alelo G de la variante del gen TNFA, se encontraron en mayor porcentaje en la población control aunque sin hallarse diferencias significativas con respecto a las poblaciones de diabéticos, como se observa en las figuras 38, 40 y 42, de forma que, de manera individual, estos alelos pueden tener una contribución pequeña sobre la protección a diabetes, pero la presencia conjunta de los mismos aumentaría de forma significativa el efecto protector de los mismos frente al desarrollo de DM1 en la población seleccionada. No hemos encontrado ningún haplotipo relacionado con

susceptibilidad al desarrollo de DM2, de manera que, en su conjunto, las variantes estudiadas de los genes IL1B, CD40, IL6 y TNFA no parecen tener influencia sobre la predisposición al desarrollo de DM2 en la población incluida en nuestro trabajo.

1.2 ESTUDIO DE LAS VARIANTES ALÉLICAS DE LAS CITOQUINAS ANTIINFLAMATORIAS

El papel de las distintas citoquinas antiinflamatorias en el desarrollo de la diabetes está siendo objeto de estudio debido a su posible efecto protector, tanto en el desarrollo la DM1, facilitando el desarrollo de los linfocitos Th2 en detrimento de los linfocitos Th1, mediadores del proceso inflamatorio que conduce a la destrucción de las células productoras de insulina (Sgouroudis y Piccirillo, 2009); como el desarrollo de la DM2, pudiendo actuar a través de la activación alternativa de los macrófagos presentes en el tejido adiposo (Odegard y Chawla, 2008).

La variante -33 C>T (rs2070874) del gen IL4 se localiza en la zona promotora del gen y se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo -523 C>T y un motivo de repetición en tándem (VNTR) localizado en el intrón 3 formando el haplotipo productor de IL4 (Nakashima et al., 2002). El alelo T de la variante -33 se asocia a una mayor producción de la citoquina y está relacionado con mayor susceptibilidad a algunas enfermedades como el asma y las alergias, mientras que ofrece protección frente a enfermedades autoinmunes mediadas por Th1, como la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide (Genevay et al., 2002).

En nuestro trabajo no hemos encontrado relación entre este polimorfismo y la susceptibilidad al desarrollo de diabetes en la población estudiada (Figuras 43 y 44), lo que nos sugieren que este polimorfismo no estaría asociado a la predisposición al desarrollo de diabetes en esta población, al igual que lo observado en otras poblaciones en las que tampoco se encuentran evidencias de asociación de esta variante y susceptibilidad ni a DM1 ni a DM2 (Maier et al., 2005; Nunez et al., 2008).

En relación con el polimorfismo 223 A>G (rs1850109) del gen IL-4R, esta variante genética da lugar a un cambio de isoleucina por valina en el codón 50 de la proteína, localizado en el dominio extracelular de la proteína (p.I50L). Estudios funcionales realizados sobre la misma, muestran que los sujetos homocigotos para valina presentan una baja respuesta a IL-4 en comparación con los homocigotos para isoleucina (Prots et al., 2006). Varios estudios de otros grupos no encuentran asociación entre este polimorfismo y DM1 (Howson et al., 2009; Qu et al., 2006), aunque un estudio de año 2002 lo incluye dentro de un haplotipo que confiere protección, especialmente en aquellos individuos que no portan el genotipo DR3/DR4 de HLA, que confiere alto riesgo de susceptibilidad a DM1 (Mirel et al., 2002). Tampoco se ha encontrado evidencia de asociación entre este polimorfismo y la obesidad, el principal factor de riesgo para la DM2 (Ha et al., 2008).

En nuestro estudio, no hallamos evidencias de asociación de este polimorfismo con la susceptibilidad al desarrollo de DM1 en la población estudiada, pero sí encontramos asociación de esta variante y la predisposición al desarrollo de DM2 (Figura 45), de manera que el genotipo AA (homocigoto para isoleucina) es más frecuente en la población control, mientras que el genotipo AG tiene una frecuencia significativamente superior en la población de pacientes con DM2, lo que nos hace pensar que el genotipo AG actuaría como marcador de riesgo para el desarrollo de DM2 en la población incluida en nuestro trabajo.

El estudio de agrupación de genotipos también muestra diferencias significativas (Figura 46), de forma que el alelo G se encuentra una proporción significativamente mayor en pacientes con DM2 en relación con los controles, lo que sugiere que la presencia del mismo supondría un factor de riesgo para este tipo de diabetes en esta población. Se desconoce el mecanismo por el cual esta variante puede influir sobre el desarrollo de la DM2, pero una posible vía podría ser a través de la activación alternativa de los macrófagos presentes en el tejido adiposo, los cuales tienen implicaciones sobre la sensibilidad de la insulina, impidiendo el desarrollo de la resistencia a la misma (Odegaard et al. 2008). La variante valina (alelo G), se asocia a una respuesta menos activa tras la unión de IL-4 (Mitsuyasu et al., 1999; Prots et

al., 2006), por lo que la presencia de esta variante puede hacer que la activación alternativa de estos macrófagos sea más débil y contribuya al desarrollo de la resistencia a la insulina en los pacientes portadores. Son necesarios más estudios para comprobar estas hipótesis y estudiar otros posibles mecanismos por los cuales esta variante génica predispone al desarrollo de DM2 en esta población.

El estudio por haplotipos de las variantes -33 C>T del gen IL4 y 223 A>G del gen IL4R mostró que el haplotipo constituido por los alelos T del gen IL4 y G del gen IL4R confiere susceptibilidad al desarrollo de la DM2, tanto en relación con controles (OR= 2,44 (1,28-4,63)), como en relación con pacientes con DM1 (OR= 2,22 (1,19-2,16)), lo que sugiere que la presencia de ambos alelos estaría directamente relacionada con el riesgo al desarrollo de DM2 (Tabla 7). No conocemos los mecanismos precisos por los cuales este haplotipo estaría implicado en el desarrollo de la DM2. IL-4 se ha relacionado con la obesidad, uno de los principales factores de riesgo para la DM2, a través de la inducción de la expresión de la hormona concentradora de melanina (PMCH), que interviene en la regulación de la homeostasis energética y la ingesta calórica (Orihara et al. 2009), por lo que una mayor producción de la citoquina, debida a la presencia del alelo T en la posición -33 de este gen puede tener alguna influencia sobre la expresión de PMCH y alterar así los mecanismos que regulan la ingesta de calorías, lo que unido al posible efecto producido por el alelo G del polimorfismo 223 A>G del gen IL-4R sobre la activación alternativa de los macrófagos residentes del tejido adiposo, podría favorecer el desarrollo de la DM2 en nuestra población. Sin embargo, no disponemos de los datos de índice de masa corporal de los pacientes con DM2, por lo que no hemos podido realizar más estudios al respecto, y serían necesarios estudios funcionales para comprobar esta hipótesis.

1.3 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO -251 A>T DEL GEN IL8

IL8 es una quimiocina que facilita la migración de células del sistema inmune al lugar de infección y se ha observado secreción de la misma, junto con otras quimiocinas como MCP-1, en respuesta a CD40 en las células ductales del páncreas (Klein et al. 2008). Por otro lado, pacientes obesos con una tolerancia a la glucosa alterada presentan altos niveles de IL-8 en el plasma (Strackowski et al., 2003). Además, esta citoquina se expresa en el tejido adiposo, junto con otras citoquinas como IL-6 y TNF- α (Hoch et al., 2008).

El polimorfismo más estudiado del gen IL8 es el cambio de adenina por timina que se produce en la posición -251, en la zona promotora de la proteína (rs4073). El alelo A está asociado a una mayor producción de la proteína y se relaciona con un incremento del riesgo en padecer nefropatía en diabéticos (Ahluwalia et al., 2009), pero no hay estudios que relacionen esta variante con susceptibilidad al desarrollo de diabetes. Nuestro estudio muestra que este polimorfismo no se asocia con susceptibilidad al desarrollo de DM1 y DM2 en la población seleccionada (Figuras 47 y 48), lo que sugiere que esta variante polimórfica no influye en la predisposición a diabetes en esta población.

El gen IL8, y más en concreto el polimorfismo -251, se ha relacionado con las complicaciones derivadas de la diabetes como la nefropatía y retinopatía diabética, de manera que el verdadero efecto de esta citoquina puede estar más relacionado con la predisposición a las complicaciones de la diabetes que a la diabetes en sí. La ausencia de datos sobre las complicaciones presentes en nuestra población no nos hace posible hacer un estudio más en profundidad sobre la relación de este polimorfismo y la susceptibilidad a las complicaciones de la diabetes.

Debido a que la secreción de IL-8 es dependiente del factor CD40 en las células ductales del páncreas, se decidió realizar un estudio por haplotipos de los polimorfismos estudiados en estos genes. Los resultados obtenidos no

mostraron evidencias de asociación de ninguna combinación de estos alelos con susceptibilidad al desarrollo de diabetes (Tabla 8), por lo que la presencia conjunta de ambas variables no parece importante en la predisposición a diabetes en la población estudiada. Sin embargo, el estudio por haplotipos del polimorfismo -251 T>A del gen IL8 junto, con los polimorfismos del resto de citoquinas proinflamatorias estudiadas anteriormente, mostró que el haplotipo compuesto por los alelos CACT de las variantes del gen IL6, TNFA, IL1B e IL8 conferiría riesgo al desarrollo de DM1 con un OR de 13,91 (1,32-146,5), mientras que el haplotipo CGCT estaría asociado a protección frente a DM1 y DM2, con un OR de 0,240 (0,08-0,679) y de 0,260 (0,112-0,601) respectivamente (Tabla 9). El haplotipo CACT se encontró con mayor frecuencia en la población de pacientes con DM2, sin embargo el programa THESIAS fue incapaz de obtener un valor de p real debido a la baja frecuencia con que se encuentra este haplotipo en las dos poblaciones, aunque es probable que este haplotipo también confiera susceptibilidad al desarrollo de DM2. Por lo tanto, la presencia del polimorfismo -251 A>T del gen IL8, junto con el resto de las variantes analizadas de las citoquinas proinflamatorias, contribuye a la susceptibilidad a diabetes en esta población.

También se observa que el alelo A del polimorfismo -238 A>G del gen TNFA es fundamental, ya se comporta como el factor clave para conferir riesgo o protección frente a diabetes, lo que apoya los resultados mostrados anteriormente sobre la influencia de este alelo en la predisposición al desarrollo de diabetes en esta población.

El haplotipo compuesto por los alelos GGTT se comporta como un factor de protección frente al desarrollo de DM2 únicamente en esta población con un OR de 0,352 (0,150-0,822). Por lo tanto, la presencia de determinadas combinaciones de alelos de estas citoquinas puede determinar riesgo o protección frente a diabetes en esta población y su implicación a nivel funcional necesita ser esclarecida.

1.4 ESTUDIO DE LAS VARIANTES ALÉLICAS 34 C>G DEL GEN PPARG E IVS3 C>T DEL GEN TCF7L2

El gen PPARG, debido a su implicación en el desarrollo y la regulación del tejido adiposo, ha sido uno de los genes más estudiados en relación con la DM2. Por otra parte, PPAR γ puede desempeñar un papel protector sobre la fisiopatología de la DM1, bien controlando la respuesta inflamatoria de linfocitos T citotóxicos, o bien a través de la inhibición de la apoptosis, reduciendo los niveles de expresión de NF- κ B (Kim et al., 2009; Raj et al., 2009). El polimorfismo 34 C>G (rs1801282) del gen PPARG ha sido uno de los polimorfismos más estudiados en relación con la diabetes; este polimorfismo afecta al codón 12 de la proteína y supone un cambio de prolina por alanina. Diversos estudios relacionan el aminoácido prolina con un aumento de hasta el 25% en la susceptibilidad a DM2, mientras que el aminoácido alanina conferiría resistencia a la diabetes (Altshuler et al., 2000; Deeb et al., 1998; Florez et al., 2003). Los portadores del alelo que codifica para alanina (G) presentan un menor índice de masa corporal y mayor sensibilidad de la insulina mientras que los portadores del alelo que codifica para prolina (C) presentan mayor resistencia a la insulina y menor sensibilidad de la misma (Buzzetti et al., 2004; Deeb et al., 1998). Sin embargo, también existen estudios en los que no se encuentra relación entre este polimorfismo y susceptibilidad a DM2 (Mancini et al., 1999; Ringel et al., 1999). En relación con la DM1, hay estudios con resultados contradictorios (Qu et al., 2008; Raj et al., 2009).

En la población incluida en nuestro trabajo no encontramos evidencias de asociación entre este polimorfismo y susceptibilidad al riesgo de diabetes (Figuras 49 y 50). Sin embargo, la población control de nuestro estudio no se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg debido a que la proporción del genotipo GG (homocigoto para alanina) aparece en una proporción muy superior a lo esperable, lo que hace que los resultados obtenidos sean de difícil interpretación. La alanina se considera un factor de protección frente a diabetes, por lo que la mayor presencia del genotipo GG en la población control podría ser debido precisamente a ese efecto protector. Los controles

de nuestro estudio presentaban un amplio rango de edad, y su característica principal es la ausencia de diabetes, lo que podría determinar la falta de equilibrio en esta población.

El gen TCF7L2 se ha considerado el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la DM2 en la mayoría de las poblaciones, aunque los mecanismos funcionales sobre el desarrollo de este tipo de diabetes aún no se conocen con exactitud. La variante IVS3 C>T (rs7903146) del gen TCF7L2, se encuentra en el intrón 3 y está en desequilibrio de ligamiento con el microsatélite DG10S478 localizado también en el intrón 3, ambos asociados a susceptibilidad a DM2. Los portadores del alelo T presentan una secreción alterada de insulina y una mayor producción hepática de glucosa, por lo que se relaciona con alta susceptibilidad a DM2; también se ha observado que el genotipo TT da lugar un aumento de la producción de la proteína en los islotes pancreáticos, lo que conduce a una disminución de la secreción de insulina dependiente de glucosa (Lyssenko et al., 2007). Por el contrario, no se han encontrado evidencias de asociación entre este polimorfismo y DM1 (Field et al., 2007).

En nuestro estudio no hemos encontrado asociación de este polimorfismo con predisposición al desarrollo de DM1 y DM2 (Figuras 51 y 52), lo que nos sugiere que esta variante génica no parece importante como marcador de susceptibilidad a diabetes en la población seleccionada en nuestro trabajo. Esta discrepancia observada con relación a los estudios previos sobre este polimorfismo puede deberse a que el tamaño muestral de nuestro estudio es bajo, en comparación con otros trabajos (Groves et al., 2006; Scott et al., 2006).

El polimorfismo 33 C>G del gen PPARG y el polimorfismo IVS3 C>T del gen TCF7L2 son considerados dos de los principales factores de riesgo para el desarrollo de la DM2, por lo que se decidió realizar un estudio de haplotipos de estas dos variantes y observar su influencia en la susceptibilidad al desarrollo de diabetes en la población estudiada. Se observó que la presencia conjunta de los alelos C y T de las variantes génica de PPARG y TCF7L2 confieren una ligera susceptibilidad al desarrollo tanto de DM1 como

de DM2 (Tabla 10), lo que sugiere que la combinación de estos alelos constituirían un marcador de susceptibilidad para diabetes en la población estudiada. La presencia de ambos alelos puede favorecer el desarrollo de la resistencia a la insulina así como una menor sensibilidad a la misma lo que contribuye un factor de riesgo para el desarrollo de DM2. Con respecto a la DM1, los mecanismos precisos por los que este haplotipo puede conferir predisposición a la misma no son conocidos, aunque un posible mecanismo podría ser a través de la regulación de algunos tipos celulares que intervienen el proceso autoinmune, como los macrófagos, ya que hay expresión de ambos genes en estas células (Baek et al., 2009; Hong y Tontonoz, 2008). Son necesarios estudios funcionales para comprobar el verdadero efecto de este haplotipo sobre el inicio y progreso de la DM1.

1.5 ESTUDIO DE VARIANTES ALÉLICAS DE GENES RELACIONADOS CON EL FUNCIONAMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR

Los factores que intervienen en la formación y regulación del endotelio pueden intervenir en el desarrollo de la diabetes como se ha observado en diferentes estudios (Lammert et al., 2003; Mosen et al., 2008; Ortmann et al., 2005). Además, estos factores pueden desempeñar funciones de señalización celular que pueden resultar claves para el inicio tanto de la DM1 como de la DM2.

El polimorfismo 594 G>T (rs5370) del gen EDN1 da lugar a un cambio en la proteína de lisina por asparragina en el codón 194, localizado cerca de la región C-terminal de la preproendotelina y que se elimina durante el procesamiento de la misma. Se piensa que este polimorfismo puede afectar a la estabilidad del mRNA, así como al procesamiento de la EDN1 (Asai et al., 2001; Tiret et al., 1999). Este polimorfismo se asocia con alta presión arterial en pacientes con hipertensión así como a los niveles de HDL (Li et al., 2008; Pare et al., 2007). Con relación a la diabetes, este polimorfismo se asocia con riesgo a retinopatía en DM2 (Li et al., 2008); sin embargo no hay estudios que

relacionen este polimorfismo con la predisposición al desarrollo de diabetes. En nuestro trabajo, no hemos encontrado asociación de este polimorfismo con susceptibilidad al desarrollo de diabetes (Figuras 53 y 54), lo que nos hace pensar que esta variante no sería importante para la susceptibilidad al desarrollo ni de DM1 ni de DM2 en la población estudiada.

El polimorfismo -2578 A>C (rs699947) del gen VEGF se localiza en la zona promotora de este gen y se piensa que este cambio afecta a la concentración de VEGF en plasma. Los haplotipos AAG y AGG (-2578 A>C, 1154 G>A y 634 G>C) se relacionan con una reducción en la transcripción del 41% y 30% respectivamente (Lambrechts et al., 2003). Se ha estudiado este polimorfismo tanto en susceptibilidad a DM1, como posible protector frente a la misma (Del Bo et al., 2006), y como modificador de la susceptibilidad a retinopatía y nefropatía diabética (Lee et al., 2006; Nakamura et al., 2009). En nuestro estudio no hemos encontrado evidencias de asociación de este polimorfismo con susceptibilidad al desarrollo de diabetes, (Figuras 55 y 56), lo que sugiere que esta variante no parece importante en la predisposición a diabetes en la población estudiada en nuestro trabajo. Este polimorfismo estaría más asociado a las complicaciones de la diabetes, sin embargo, la ausencia de datos acerca de las mismas en los pacientes incluidos en nuestro estudio no nos permiten analizar este aspecto.

El polimorfismo 894 G>T (rs1799983) del gen NOS3 produce un cambio en la proteína de ácido glutámico por ácido aspártico en la posición 298, localizado en el exón 7, y que afecta a la estabilidad de la proteína (Szabo et al., 2009). Este cambio se ha asociado a susceptibilidad a la disfunción endotelial, de forma que los portadores de aspártico presenta riesgo a enfermedad cardiovascular (Casas et al., 2004; Hingorani et al., 1999). No se han encontrado estudios que relacionen este polimorfismo con susceptibilidad a DM. En nuestro trabajo, no encontramos evidencias de asociación entre esta variante génica y susceptibilidad al desarrollo de DM1 y DM2 (Figuras 57 y 58), por lo que este polimorfismo no sería un marcador de susceptibilidad para el desarrollo de diabetes en esta población.

El estudio de los distintos haplotipos de los polimorfismos 594 G>T del gen EDN1, -2578 A>C del gen VEGF y 894 G>T del gen NOS3 tampoco muestra asociación con susceptibilidad a diabetes en nuestro trabajo, lo que sugiere que ninguno de los haplotipos formados por estas variantes génicas estaría relacionado con predisposición al desarrollo de DM1 o DM2 en esta población (tabla 11). Todos estos genes se han relacionado más con las complicaciones de la diabetes que con la susceptibilidad a la misma, sin embargo, la ausencia de datos no nos ha permitido realizar un estudio más en profundidad de las mismas.

1.6 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO 49 A>G DEL GEN CTLA4

El gen CTLA4 es clave para la inactivación de la respuesta inflamatoria mediada por linfocitos T, lo que resulta especialmente importante en la fisiopatología de la DM1 y también puede tener influencia en el progreso de la DM2. Diversos estudios apoyan su papel como marcador de susceptibilidad para DM1 y también para otras enfermedades autoinmunes como la tiroiditis de Hashimoto, la enfermedad de Addison o el lupus sistémico eritematoso (Barreto et al. 2004; Donner et al. 1997).

El polimorfismo 49 A>G del gen CTLA4 se localiza en el exón 1, dentro del péptido líder y se traduce en un cambio de alanina por treonina en el codón 17. Este cambio se asocia a susceptibilidad a DM1, aunque no en todas las poblaciones estudiadas hasta el momento, de forma que, mientras en la población portuguesa no se ha encontrado asociación entre este polimorfismo y susceptibilidad a DM1, en otras poblaciones como las de Europa del Este o China sí se encuentra asociación (Ahmedov et al., 2006; Lee et al., 2000; Lemos et al., 2009). Por otro lado, no se ha encontrado asociación de esta variante con la predisposición al desarrollo de DM2 (Rau et al., 2001). En la población incluida en nuestro trabajo, el estudio del polimorfismo 49 A>G de CTLA4 muestra que no está asociado a susceptibilidad al desarrollo de DM1 y DM2 (Figuras 59 y 60), de la misma forma a lo encontrado en poblaciones

de características parecidas a la estudiada en nuestro trabajo como la población portuguesa (Lemos et al., 2009).

1.7 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO 293 C>T DEL GEN HNF1A

HNF1A es uno de los factores de transcripción implicados en el funcionamiento de las células productoras de insulina del páncreas. Mutaciones en este gen son la causa del desarrollo de diabetes MODY y algunos polimorfismo se han asociado con susceptibilidad al desarrollo de DM2 (Urhammer et al., 1997b). Uno de los polimorfismos del gen HNF1A más estudiados en relación con predisposición al desarrollo de diabetes es el polimorfismo 293 C>T (rs1800574), que da lugar a un cambio de alanina por valina en la posición 98 de la proteína, localizado entre el dominio de dimerización y de unión a DNA y dentro de una zona muy conservada a lo largo de la evolución. Diversos estudios relacionan la valina con un descenso de hasta el 20% en la secreción de insulina y péptido C, aunque no altera la sensibilidad de la insulina, por lo que tiene un incremento modesto del riesgo a DM2 (Urhammer et al., 1997a; Winckler et al., 2005). En nuestro estudio, no encontramos asociación entre esta variante y susceptibilidad al desarrollo de diabetes (Figura 61), lo que sugiere que el polimorfismo 293 C>T del gen HNF1A no parece contribuir a la susceptibilidad al desarrollo de DM1 o DM2 en la población estudiada. La ausencia de otros datos clínicos como niveles de péptido C o de autoanticuerpos nos hace imposible realizar un estudio más en profundidad de este polimorfismo y su influencia en los niveles de secreción de insulina, o en su frecuencia en aquellos DM1 que no presentan autoanticuerpos como se observa en otros estudios previos.

1.8 CONCLUSIONES GENERALES DEL ESTUDIO DE VARIANTES GENÉTICAS RELACIONADAS CON LA SUSCEPTIBILIDAD AL DESARROLLO DE DIABETES

Tanto la DM1 como la DM2 son enfermedades complejas en las que intervienen numerosos factores, cuyo nivel de importancia dependerá, no solo de la función que desempeñen dentro de la fisiopatología de la diabetes, si no también, de la distinta composición genética de las poblaciones estudiadas, por lo que establecer variantes de susceptibilidad universales resulta sumamente complicado. En nuestro trabajo los tres grupos de población estudiados se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg, excepto para el polimorfismo 34 C>G del gen PPARG en la población control y los resultados obtenidos del estudio de las distintas variantes de genes relacionados con predisposición al desarrollo de diabetes, sugieren que la variantes -238 A>G del gen TNFA confiere un aumento de la susceptibilidad al desarrollo de DM1 y de DM2, mientras que el polimorfismo 223 A>G del gen IL-4R contribuye a aumentar la susceptibilidad al desarrollo de DM2. Además, en el caso del polimorfismo del gen TNFA hemos observado diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes con diabetes, por lo que esta variante podría ser un marcador de diferenciación entre ambos tipos de diabetes, poniendo de manifiesto que, a pesar de que la sintomatología clínica de los pacientes afectados sea muy similar, los mecanismos fisiopatológicos que subyacen en ambos casos son diferentes y, en el caso de TNF- α , la presencia de un genotipo u otro puede contribuir hacia la predisposición a un tipo frente a otro. Las diferencias atribuidas a la presencia de uno u otro genotipo y su implicación en a nivel fisiopatológico necesitan ser esclarecidas.

Por otro lado, el estudio por haplotipos de genes con una función parecida, nos sugiere que las variantes genéticas de las citoquinas proinflamatorias estudiadas por nosotros pueden contribuir a modificar la susceptibilidad al desarrollo de la DM1, mientras que el grupo de citoquinas antiinflamatorias estarían más relacionadas con la susceptibilidad al desarrollo de la DM2 en la población incluida en nuestro trabajo, lo que pone de manifiesto una vez más que ambas entidades presentan mecanismos

diferentes para su desarrollo (Raj et al., 2009). El haplotipo compuesto por las variantes génicas estudiadas de los genes PPARG y TCF7L2 confiere un riesgo bajo para el desarrollo tanto de DM1 como de DM2, mientras que los factores relacionados con el funcionamiento del endotelio vascular no serían importantes como marcadores de susceptibilidad al desarrollo de diabetes en esta población. El resto de los genes estudiados como las variantes de IL8, CTLA4 y HNF1A tampoco influyen en la susceptibilidad a diabetes en la población objeto de nuestro estudio.

La ausencia de más datos clínicos como el índice de masa corporal, así como de datos relacionados con posibles complicaciones que puedan presentar estos pacientes nos hace impide realizar un estudio más en profundidad de todas estas variantes en la población estudiada en este trabajo.

2. ESTUDIO GENÉTICO DE DIABETES MODY

La diabetes MODY es un tipo de diabetes poco frecuente, (5% de los casos de DM2) caracterizada por una edad de aparición temprana, antes de los 25 años, ausencia de autoinmunidad y de otras características clínicas como el síndrome metabólico, así como un patrón de herencia autosómico dominante.

Nosotros hemos estudiado 55 pacientes con sospecha diagnóstica de diabetes MODY y los resultados obtenidos mostraron que las mutaciones más frecuentes en la población estudiada se encuentran en el gen HNF1A, representado el 12,7% del total de los pacientes estudiados, por lo que el tipo de diabetes MODY más frecuente en esta población es la diabetes MODY3, (Tabla 21). Los estudios previos realizados a este respecto en la población española son contradictorios (Costa et al., 2000; Estalella et al., 2007) y estudios en otras poblaciones también muestran diferente prevalencia de los distintos tipos de diabetes MODY, de manera que en algunos países como Francia el tipo de diabetes MODY más frecuente es el tipo 2 mientras que en Reino Unido u Holanda la diabetes MODY 3 representa el mayor porcentaje de diabetes MODY (Chevre et al., 1998; Frayling et al., 2001; Losekoot et al.,

2005). La discrepancia entre los estudios realizados en España y en el resto de Europa puede ser debido a la selección de los pacientes, ya que la diabetes MODY 2 suele aparecer a edades más tempranas que MODY 3, de manera que el reclutamiento de pacientes de mayor edad puede favorecer el hallazgo de mutaciones en el gen HNF1A frente al gen GCK (Costa et al., 2000; Estalella et al., 2007). En nuestra serie, la edad media de los pacientes fue de 35 años, lo que puede explicar que el porcentaje de diabetes MODY 3 sea más alto.

Las características clínicas de los pacientes de nuestro estudio con mutaciones en el gen GCK no difieren demasiado de las de los pacientes con mutaciones en el gen HNF1A, ya que, tanto la edad de inicio media como la glucemia basal en ayunas media es muy similar, aunque otros parámetros, como el control glicémico, obtenido de la medida del porcentaje de hemoglobina glicosilada, así como el tratamiento empleado y el índice de masa corporal, muestran diferencias más marcadas entre ambos grupos de pacientes (Tablas 15 y 18). El pequeño porcentaje de pacientes con mutaciones en el gen GCK y en el gen HNF1A puede influir en que estas diferencias no sean tan evidentes como en otros estudios (Estalella et al. 2007). Por otro lado, la ausencia de datos clínicos sobre el paciente con mutación en el gen HNF4A tampoco impide poder compararlo con los otros dos tipos de MODY.

La mayoría de las mutaciones encontradas en los tres genes provocan la pérdida de gran parte de la proteína, mientras que las mutaciones de cambio de aminoácido son mucho menos frecuentes, (Tablas 12, 16 y 19). Sin embargo, el tipo de mutación no se relaciona con las características clínicas de los pacientes, aunque se observó que las mutaciones en las que se producen inserciones o deleciones dan lugar a un fenotipo ligeramente más severo y una edad de aparición más temprana, debido a que se pierde la mayor parte de la proteína, o a que los dominios a los que afecta son claves para el funcionamiento de la proteína.

El estudio de la mutación no descrita p.K205N del gen HNF1A mostró que este cambio disminuye la capacidad de activar la transcripción, lo que

sugiere que esta mutación sería la responsable del desarrollo de la diabetes en la paciente que la porta. Esta mutación se localiza en la región de unión al DNA, dentro de una zona muy conservada. El estudio realizado sobre 100 controles mostró que este cambio no se encontraba en ninguno de ellos, lo que sugiere que no es una variante polimórfica y los estudios *in silico* mostraron que este cambio podía afectar a la función de la proteína, lo que fue confirmado posteriormente con el ensayo de actividad luciferasa. Este ensayo mostró una pérdida de actividad en la proteína mutada con respecto a la proteína silvestre, debido a una pérdida en la capacidad de unión al promotor del gen diana, en nuestro caso a GLUT2 (Figura 69). Un estudio funcional previo realizado sobre la mutación p. K205Q ofreció unos resultados similares (Vaxillaire et al., 1999), por lo que las mutaciones en este codón modifican la capacidad de unión de HNF1 α al DNA, y por tanto, impiden la regulación de los genes diana de esta proteína.

Por otro lado, la mutación no descrita T137fsX154 del gen HNF1A provocaría la pérdida de gran parte de la proteína, lo que nos hace pensar que esta mutación también sería responsable de la enfermedad en los pacientes que la presentan, al igual que ocurre con la mutación ya descrita P291fsX316, que también encontramos en nuestro trabajo. Esta mutación es una de las más recurrentes en todas las poblaciones estudiadas. Los estudios funcionales realizados sobre la misma determinan que la proteína truncada generada como consecuencia de esta mutación actuaría como una isoforma dominante negativa impidiendo la función de la proteína normal (Yamagata et al., 2003).

La otra mutación en el gen HNF1A encontrada en nuestro trabajo fue el cambio p.E48K. Estudios previos sobre esta mutación mostraban que la mutación se segregaba con la enfermedad y que este cambio puede afectar a la capacidad de dimerización de la proteína (Moller et al, 1998).

Con respecto a las mutaciones encontradas en el gen GCK, las mutaciones p.Q337X y F316SfsX25, descritas por primera vez en nuestro trabajo, provocan la pérdida de dominios importantes para el funcionamiento de la enzima, (Figuras 71 y 73), lo que sugiere que serían las responsables de la aparición de diabetes en los pacientes portadores. Por otra parte, la

mutación p.E256K afecta a la capacidad de la enzima para unirse a la glucosa (Gidh-Jain et al., 1992), por lo que también sería responsable de la aparición de diabetes en los pacientes portadores.

La mutación p.R131X del gen HNF1A también genera una proteína truncada que pierde la mayor parte de los dominios funcionales de este factor, lo que impide el funcionamiento normal de mismo y sería, en último término, el responsable de la enfermedad.

Pese al gran número de mutaciones descritas en los tres genes durante los últimos años, en nuestro estudio hemos encontrado un total de cinco mutaciones sin describir, lo que pone de manifiesto la complejidad de tipo de diabetes y la falta de un conocimiento completo sobre las mutaciones que afectan a estos genes.

El estudio de las nuevas isoformas de HNF1A descritas por primera vez en nuestro trabajo, nos mostraron que la pérdida de exones o la inclusión de intrones modifican de forma drástica la actividad de la proteína. Estas isoformas fueron encontradas de forma causal durante el proceso de clonación de la isoforma completa del gen HNF1A en las células HepG2, y se deben a variaciones en el procesamiento del RNA. La caracterización funcional, mediante el ensayo de actividad luciferasa realizado de la isoforma que carece del exón 2, y que, por tanto, pierde los dominios de unión a DNA y de transactivación, presentaba una actividad muy reducida, mientras que los experimentos realizados con la isoforma que contiene el intrón 8 mostraron un aumento de la actividad de HNF1A de hasta el 57%, (Figura 70). La presencia del intrón 8, da lugar a la inserción de 31 aminoácidos que forman una estructura en espiral dentro del dominio de transactivación, generándose una proteína que modifica la conformación de la misma (Figura 69). Las isoformas caracterizadas previamente, como HNF1A-B y HNF1A-C que carecen de los exones 7,8, 9 y 10 y los exones 6, 7, 8, 9 y 10 respectivamente, tienen más capacidad transactivadora que la isoforma completa (Bach et al., 1990; Harries et al., 2006), lo que indica que en la conformación de esta zona son cruciales para la actividad transactivadora de esta proteína. La mayor capacidad de activación de la transcripción de la isoforma que contiene el

intrón 8 puede ser debida a que su interacción con otros mediadores proteicos sea diferente con respecto a HNF1A *wild type* y que esto afecte a su actividad (Bach et al., 1993), o bien a que la estructura generada sea termodinámicamente más estable que la proteína *wild type*, lo que puede favorecer su mayor capacidad transactivadora.

Además, la presencia de estas nuevas isoformas nos sugiere la existencia de isoformas generadas por procesamiento alternativo que se suma al mecanismo de poliadenilación ya descrito para las isoformas HNF1A-B y HNF1A-C (Bach et al., 1993). El procesamiento de los exones comienza por el reconocimiento de la secuencia GT en la región 5' del exón por parte del factor snRNPU1 y por la unión del factor SF1 al sitio de ramificación. Posteriormente, se produce la unión del factor auxiliar U2AF al tracto de polipirimidas y a la secuencia AG situada en la zona 3' del exón (Chen et al., 2009). El exón 2 del gen HNF1A está flanqueado por dos intrones muy largos, lo que puede favorecer su procesamiento y eliminación en la isoforma HNF1A $\Delta 2$, mientras que el intrón 8 es muy corto, solo contiene 93 nucleótidos, lo que puede impedir que sea reconocido por el espliceosoma, facilitando su retención en la isoforma HNF1A insIVS8 (Keren et al., 2010). Los mecanismos que condicionan este procesamiento alternativo y, por tanto, la generación de estas nuevas isoformas dependen, no solo del reconocimiento de secuencias de procesamiento diferentes de las canónicas por parte de la maquinaria así como de secuencias reguladoras del mismo localizadas dentro de los exones (ESS y ESE), si no también de los factores ambientales en los que se encuentre la célula en ese momento. La presencia de transcritos diferentes, que, en algunos casos, presentan una actividad muy superior a la de la proteína normal, puede ayudar a la caracterización de nuevas dianas terapéuticas. Serán necesarios más estudios que determinen si estas nuevas isoformas regulan la actividad de HNF1A, así como su expresión en otros tejidos como páncreas e intestino y si la presencia de la isoforma HNF1A insIVS8 puede compensar mutaciones presentes en HNF1A.

Finalmente, en el 74,4 % de los pacientes estudiados no hemos encontrado ninguna mutación en los genes incluidos en este trabajo, lo que no significa que no puedan tener mutaciones en otras zonas, como las regiones

promotoras, así como otro tipo de cambios, como grandes reordenamientos genéticos, que no han sido analizados en nuestro estudio. Además, tampoco podemos descartar la posibilidad de que los polimorfismos encontrados en muchos de estos pacientes, especialmente aquellos que se encuentran cerca de las regiones procesadoras de los exones como el encontrado en la posición +6 del intrón 4 del gen HNF4A, que no fue encontrado en ninguno de los controles analizados, puedan modificar el procesamiento del gen e influir en el desarrollo de este tipo de diabetes.

Las mutaciones en los otros genes MODY como HNF1B, IPF-1 o NeuroD6 se acompañan de manifestaciones clínicas particulares que no estaban presentes en los pacientes de nuestro estudio, por lo que es poco probable que haya portadores de mutaciones en los mismos.

Es posible que estos pacientes pertenezcan al grupo de la denominada diabetes MODY X, en el cual, se incluyen pacientes que cumplen con los criterios de diagnóstico de MODY pero no presentan mutaciones en ninguno de los genes conocidos. El porcentaje de MODY X encontrado en España oscila entre el 40% y el 10,5%, mientras que en otras poblaciones, como la alemana, puede ser de hasta el 74% (Ziemssen et al., 2002). No se conocen los genes responsables de este tipo de MODY aunque se especula que genes como Kir6.2, un canal de potasio relacionado con la secreción de insulina, puedan estar detrás de este tipo de diabetes (Fernandez, 2006). Por tanto, es necesaria la búsqueda y caracterización de nuevos genes diana que permitan un mejor diagnóstico de estos pacientes.

.

6. CONCLUSIONES

1. El estudio de caracterización de variantes alélicas asociadas a la susceptibilidad al desarrollo de diabetes mostró que en nuestra serie:

a) El haplotipo CCGA compuesto por los polimorfismos -511C>T del gen IL-1B, -1C>T del gen CD40, -174 C>G del gen IL-6 y -238 A>G del gen TNF-A y el haplotipo CACT compuesto por los polimorfismos -174 C>G del gen IL-6, -238 A>G del gen TNF-A, -511 C>T del gen IL-1B y -251 A>T del gen IL-8 se asocian a una mayor susceptibilidad al desarrollo de diabetes tipo 1.

b) El haplotipo TG compuesto por los polimorfismos -33C>T del gen IL-4 y 223 A>G del gen IL-4R se asocian a una mayor susceptibilidad al desarrollo de diabetes tipo 2.

c) El haplotipo CT compuesto por los polimorfismos 34C>G del gen PPARG e IVS3 C>T del gen TCF7L2 se asocia al desarrollo de diabetes tipo 1 y tipo 2.

2. En nuestra serie, el polimorfismo -238 A>G del gen TNF-A tiene una distribución diferente entre el grupo de pacientes con diabetes tipo 1 y los pacientes con diabetes tipo 2, sugiriendo que las variaciones en los niveles de TNF- α asociados con este polimorfismo están implicados en la susceptibilidad a desarrollar diabetes

3. La diabetes MODY3 representa el tipo de diabetes MODY mayoritario en la población estudiada en nuestro trabajo

4. La mutación p.K205N del gen HNF1A descrita por primera vez en este trabajo, altera la capacidad de unión de la proteína al DNA, siendo éste el mecanismo responsable de la hiperglucemia en los portadores de la mutación

5. En este trabajo caracterizamos por primera vez dos nuevos transcritos debidos al procesamiento alternativo del RNA del gen HNF1. La isoforma HNF1A Δ 2 se asocia con una disminución de la actividad de la proteína mientras que la isoforma HNF1A insIVS8 se asocia con un aumento de la actividad de la misma, abriendo la puerta al diseño de estrategias terapéuticas que estimulen la síntesis de esta isoforma para el tratamiento de la diabetes.

7. BIBIOGRAFÍA

1. Aamodt, G., Stene, L.C., Njolstad, P.R., Sovik, O., and Joner, G. (2007). Spatiotemporal trends and age-period-cohort modeling of the incidence of type 1 diabetes among children aged <15 years in Norway 1973-1982 and 1989-2003. *Diabetes care* 30, 884-889.
2. Ahlgren, U., Jonsson, J., Jonsson, L., Simu, K., and Edlund, H. (1998). beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ip1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes & development* 12, 1763-1768.
3. Ahluwalia, T.S., Khullar, M., Ahuja, M., Kohli, H.S., Bhansali, A., Mohan, V., Venkatesan, R., Rai, T.S., Sud, K., and Singal, P.K. (2009). Common variants of inflammatory cytokine genes are associated with risk of nephropathy in type 2 diabetes among Asian Indians. *PloS one* 4, e5168.
4. Ahmedov, G., Ahmedova, L., Sedlakova, P., and Cinek, O. (2006). Genetic association of type 1 diabetes in an Azerbaijanian population: the HLA-DQ, -DRB1*04, the insulin gene, and CTLA4. *Pediatric diabetes* 7, 88-93.
5. Alam, C., Valkonen, S., Ohls, S., Tornqvist, K., and Hanninen, A. Enhanced trafficking to the pancreatic lymph nodes and auto-antigen presentation capacity distinguishes peritoneal B lymphocytes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 53, 346-355.
6. Alegre, M., Fallarino, F., Zhou, P., Frauwirth, K., Thistlethwaite, J., Newell, K., Gajewski, T., and Bluestone, J. (2001). Transplantation and the CD28/CTLA4/B7 pathway. *Transplantation proceedings* 33, 209-211.
7. Altshuler, D., Hirschhorn, J.N., Klannemark, M., Lindgren, C.M., Vohl, M.C., Nemesh, J., Lane, C.R., Schaffner, S.F., Bolk, S., Brewer, C., *et al.* (2000). The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nature genetics* 26, 76-80.
8. Arden, C., Harbottle, A., Baltrusch, S., Tiedge, M., and Agius, L. (2004). Glucokinase is an integral component of the insulin granules in glucose-responsive insulin secretory cells and does not translocate during glucose stimulation. *Diabetes* 53, 2346-2352.
9. Asai, T., Ohkubo, T., Katsuya, T., Higaki, J., Fu, Y., Fukuda, M., Hozawa, A., Matsubara, M., Kitaoka, H., Tsuji, I., *et al.* (2001). Endothelin-1 gene variant associates with blood pressure in obese Japanese subjects: the Ohasama Study. *Hypertension* 38, 1321-1324.
10. Atkinson, M.A., and Eisenbarth, G.S. (2001). Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 358, 221-229.
11. Bach, I., Galcheva-Gargova, Z., Mattei, M.G., Simon-Chazottes, D., Guenet, J.L., Cereghini, S., and Yaniv, M. (1990). Cloning of human hepatic nuclear factor 1 (HNF1) and chromosomal localization of its gene in man and mouse. *Genomics* 8, 155-164.
12. Bach, I., y Yaniv, M. (1993). More potent transcriptional activators or a transdominant inhibitor of the HNF1 homeoprotein family are generated by alternative RNA processing. *The EMBO journal* 12, 4229-4242.
13. Bach, L.A., Dean, R., Youssef, S., and Cooper, M.E. (2000). Aminoguanidine ameliorates changes in the IGF system in experimental diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 15, 347-354.

14. Baek, Y.S., Haas, S., Hackstein, H., Bein, G., Hernandez-Santana, M., Lehrach, H., Sauer, S., and Seitz, H. (2009). Identification of novel transcriptional regulators involved in macrophage differentiation and activation in U937 cells. *BMC immunology* 10, 18.
15. Bahillo, M.P., Hermoso, F., Ochoa, C., Garcia-Fernandez, J.A., Rodrigo, J., Marugan, J.M., de la Torre, S., Manzano, F., Lema, T., and Garcia-Velazquez, J. (2007). Incidence and prevalence of type 1 diabetes in children aged <15 yr in Castilla-Leon (Spain). *Pediatric diabetes* 8, 369-373.
16. Baltrusch, S., Langer, S., Massa, L., Tiedge, M., and Lenzen, S. (2006). Improved metabolic stimulus for glucose-induced insulin secretion through GK and PFK-2/FBPase-2 coexpression in insulin-producing RINm5F cells. *Endocrinology* 147, 5768-5776.
17. Barreto M, Santos E, Ferreira R, Fesel C, Fontes MF, Pereira C, Martins B, Andreia R, Viana JF, Crespo F, Vasconcelos C, Ferreira C, Vicente AM. (2004). Evidence for CTLA4 as a susceptibility gene for systemic lupus erythematosus. *European Journal of Human Genetics* 12, 620-626.
18. Barrio, R., Bellanne-Chantelot, C., Moreno, J.C., Morel, V., Calle, H., Alonso, M., and Mustieles, C. (2002). Nine novel mutations in maturity-onset diabetes of the young (MODY) candidate genes in 22 Spanish families. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87, 2532-2539.
19. Basili, S., Pacini, G., Guagnano, M.T., Manigrasso, M.R., Santilli, F., Pettinella, C., Ciabattini, G., Patrono, C., and Davi, G. (2006). Insulin resistance as a determinant of platelet activation in obese women. *Journal of the American College of Cardiology* 48, 2531-2538.
20. Bastard, J.P., Maachi, M., Van Nhieu, J.T., Jardel, C., Bruckert, E., Grimaldi, A., Robert, J.J., Capeau, J., and Hainque, B. (2002). Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87, 2084-2089.
21. Bayley JP, de Rooij H, van den Elsen PJ, Huizinga TW, Verweij CL. (2001). Functional analysis of linker-scan mutants spanning the -376, -308, -244, and -238 polymorphic sites of the TNF-alpha promoter. *Cytokine* 14, 316-323.
22. Bergin, A.M., Balder, B., Kishore, S., Sward, K., Hahn-Zoric, M., Lowhagen, O., Hanson, L.A., and Padyukov, L. (2006). Common variations in the IL4R gene affect splicing and influence natural expression of the soluble isoform. *Human mutation* 27, 990-998.
23. Berne, M.L.y.R. (2001). *Principles of Physiology, Vol I, 3rd edn* (Harcourt International).
24. Bian, Z.M., Elner, V.M., Yoshida, A., Kunkel, S.L., and Elner, S.G. (2001). Signaling pathways for glycated human serum albumin-induced IL-8 and MCP-1 secretion in human RPE cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 42, 1660-1668.
25. Bjorkhaug, L., Molnes, J., Sovik, O., Njolstad, P.R., and Flatmark, T. (2007). Allosteric activation of human glucokinase by free polyubiquitin chains and its ubiquitin-dependent cotranslational proteasomal degradation. *The Journal of biological chemistry* 282, 22757-22764.
26. Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., *et al.* (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385, 729-733.
27. Boiteux, A., and Hess, B. (1981). Design of glycolysis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 293, 5-22.

28. Boj, S.F., Parrizas, M., Maestro, M.A., and Ferrer, J. (2001). A transcription factor regulatory circuit in differentiated pancreatic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 14481-14486.
29. Bottini, N., Musumeci, L., Alonso, A., Rahmouni, S., Nika, K., Rostamkhani, M., MacMurray, J., Meloni, G.F., Lucarelli, P., Pellicchia, M., *et al.* (2004). A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nature genetics* 36, 337-338.
30. Brillon, D.J., Henry, R.R., Klein, H.H., Olefsky, J.M., and Freidenberg, G.R. (1988). Functional and structural differences in human and rat-derived insulin receptors: characterization of the beta-subunit kinase activity. *Endocrinology* 123, 1837-1847.
31. Bugawan, T.L., Mirel, D.B., Valdes, A.M., Panelo, A., Pozzilli, P., and Erlich, H.A. (2003). Association and interaction of the IL4R, IL4, and IL13 loci with type 1 diabetes among Filipinos. *American journal of human genetics* 72, 1505-1514.
32. Buzzetti, R., Petrone, A., Ribaudo, M.C., Alemanno, I., Zavarella, S., Mein, C.A., Maiani, F., Tiberti, C., Baroni, M.G., Vecchi, E., *et al.* (2004). The common PPAR-gamma2 Pro12Ala variant is associated with greater insulin sensitivity. *Eur J Hum Genet* 12, 1050-1054.
33. Cardenas, M.L., Cornish-Bowden, A., and Ureta, T. (1998). Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochimica et biophysica acta* 1401, 242-264.
34. Casas, J.P., Bautista, L.E., Humphries, S.E., and Hingorani, A.D. (2004). Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation* 109, 1359-1365.
35. Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J.C., Jorns, A., Lenzen, S., and Eizirik, D.L. (2005). Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* 54 Suppl 2, S97-107.
36. Coffinier, C., Thepot, D., Babinet, C., Yaniv, M., and Barra, J. (1999). Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1beta in visceral endoderm differentiation. *Development (Cambridge, England)* 126, 4785-4794.
37. Colletti, M., Cicchini, C., Conigliaro, A., Santangelo, L., Alonzi, T., Pasquini, E., Tripodi, M., and Amicone, L. (2009). Convergence of Wnt signaling on the HNF4alpha-driven transcription in controlling liver zonation. *Gastroenterology* 137, 660-672.
38. Corbett, J.A., Kwon, G., Turk, J., and McDaniel, M.L. (1993). IL-1 beta induces the coexpression of both nitric oxide synthase and cyclooxygenase by islets of Langerhans: activation of cyclooxygenase by nitric oxide. *Biochemistry* 32, 13767-13770.
39. Costa, A., Bescos, M., Velho, G., Chevre, J., Vidal, J., Sesmilo, G., Bellanne-Chantelot, C., Froguel, P., Casamitjana, R., Rivera-Fillat, F., *et al.* (2000). Genetic and clinical characterisation of maturity-onset diabetes of the young in Spanish families. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 142, 380-386.
40. Chatterjee, A., Black, S.M., and Catravas, J.D. (2008). Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascular pharmacology* 49, 134-140.
41. Chen, H., Cong, L.N., Li, Y., Yao, Z.J., Wu, L., Zhang, Z.Y., Burke, T.R., Jr., and Quon, M.J. (1999). A phosphotyrosyl mimetic peptide reverses impairment of insulin-stimulated translocation of GLUT4 caused by overexpression of PTP1B in rat adipose cells. *Biochemistry* 38, 384-389.

42. Chevre, J.C., Hani, E.H., Boutin, P., Vaxillaire, M., Blanche, H., Vionnet, N., Pardini, V.C., Timsit, J., Larger, E., Charpentier, G., *et al.* (1998). Mutation screening in 18 Caucasian families suggest the existence of other MODY genes. *Diabetologia* 41, 1017-1023.
43. Chi, Y.I., Frantz, J.D., Oh, B.C., Hansen, L., Dhe-Paganon, S., and Shoelson, S.E. (2002). Diabetes mutations delineate an atypical POU domain in HNF-1alpha. *Molecular cell* 10, 1129-1137.
44. Chomczynski, P., y Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162, 156-159.
45. Chu, K., Nemoz-Gaillard, E., and Tsai, M.J. (2001). BETA2 and pancreatic islet development. Recent progress in hormone research 56, 23-46.
46. D'Alfonso, S., y Richiardi, P.M. (1994). A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. *Immunogenetics* 39, 150-154.
47. Davi, G., Belvedere, M., Vigneri, S., Catalano, I., Giammarresi, C., Roccaforte, S., Consoli, A., and Mezzetti, A. (1996). Influence of metabolic control on thromboxane biosynthesis and plasma plasminogen activator inhibitor type-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Thrombosis and haemostasis* 76, 34-37.
48. Davidson, M.B. Correction to the 2010 report on the diagnosis and classification of diabetes. *Diabetes care* 33, e57.
49. Deeb, S.S., Fajas, L., Nemoto, M., Pihlajamaki, J., Mykkanen, L., Kuusisto, J., Laakso, M., Fujimoto, W., and Auwerx, J. (1998). A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nature genetics* 20, 284-287.
50. Del Bo, R., Scarlato, M., Ghezzi, S., Maestroni, A., Sjolind, L., Forsblom, C., Wessman, M., Groop, P.H., Comi, G.P., Bresolin, N., *et al.* (2006). VEGF gene variability and type 1 diabetes: evidence for a protective role. *Immunogenetics* 58, 107-112.
51. Del Bo, R., Scarlato, M., Ghezzi, S., Martinelli Boneschi, F., Fenoglio, C., Galbiati, S., Virgilio, R., Galimberti, D., Galimberti, G., Crimi, M., *et al.* (2005). Vascular endothelial growth factor gene variability is associated with increased risk for AD. *Annals of neurology* 57, 373-380.
52. Despres, J.P. (2001). Health consequences of visceral obesity. *Annals of medicine* 33, 534-541.
53. Docherty, H.M., Hay, C.W., Ferguson, L.A., Barrow, J., Durward, E., and Docherty, K. (2005). Relative contribution of PDX-1, MafA and E47/beta2 to the regulation of the human insulin promoter. *The Biochemical journal* 389, 813-820.
54. Donner H, Braun J, Seidl C, Rau H, Finke R, Ventz M, Walfish PG, Usadel KH, Badenhop K. (1997). *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82, 4130-4132
55. Duncan, S.A., Nagy, A., and Chan, W. (1997). Murine gastrulation requires HNF-4 regulated gene expression in the visceral endoderm: tetraploid rescue of Hnf-4(-/-) embryos. *Development (Cambridge, England)* 124, 279-287.
56. Dunn-Meynell, A.A., Routh, V.H., Kang, L., Gaspers, L., and Levin, B.E. (2002). Glucokinase is the likely mediator of glucosensing in both glucose-excited and glucose-inhibited central neurons. *Diabetes* 51, 2056-2065.

57. Dyachok, O., Tufveson, G., and Gylfe, E. (2004). Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release by activation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in primary pancreatic beta-cells. *Cell calcium* 36, 1-9.
58. Egan, J.M., Meneilly, G.S., Habener, J.F., and Elahi, D. (2002). Glucagon-like peptide-1 augments insulin-mediated glucose uptake in the obese state. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87, 3768-3773.
59. Eizirik, D.L., and Darville, M.I. (2001). beta-cell apoptosis and defense mechanisms: lessons from type 1 diabetes. *Diabetes* 50 Suppl 1, S64-69.
60. Elbrecht, A., Chen, Y., Cullinan, C.A., Hayes, N., Leibowitz, M., Moller, D.E., and Berger, J. (1996). Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2. *Biochemical and biophysical research communications* 224, 431-437.
61. Erlich, H.A., Lohman, K., Mack, S.J., Valdes, A.M., Julier, C., Mirel, D., Noble, J.A., Morahan, G.E., and Rich, S.S. (2009). Association analysis of SNPs in the IL4R locus with type I diabetes. *Genes and immunity* 10 Suppl 1, S33-41.
62. Estalella, I., Garcia-Gimeno, M.A., Marina, A., Castano, L., and Sanz, P. (2008). Biochemical characterization of novel glucokinase mutations isolated from Spanish maturity-onset diabetes of the young (MODY2) patients. *Journal of human genetics* 53, 460-466.
63. Estalella, I., Rica, I., Perez de Nanclares, G., Bilbao, J.R., Vazquez, J.A., San Pedro, J.I., Busturia, M.A., and Castano, L. (2007). Mutations in GCK and HNF-1alpha explain the majority of cases with clinical diagnosis of MODY in Spain. *Clinical endocrinology* 67, 538-546.
64. Fajans, S.S. (1989). Maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Diabetes/metabolism reviews* 5, 579-606.
65. Fajans, S.S., Bell, G.I., and Polonsky, K.S. (2001). Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *The New England journal of medicine* 345, 971-980.
66. Farrelly, A.M., Wobser, H., Bonner, C., Anguissola, S., Rehm, M., Concannon, C.G., Prehn, J.H., and Byrne, M.M. (2009). Early loss of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signalling and reduction in cell size during dominant-negative suppression of hepatic nuclear factor 1-alpha (HNF1A) function in INS-1 insulinoma cells. *Diabetologia* 52, 136-144.
67. Fava, D., Leslie, R.D., and Pozzilli, P. (1994). Relationship between dairy product consumption and incidence of IDDM in childhood in Italy. *Diabetes care* 17, 1488-1490.
68. Fell, D.A. (1992). Metabolic control analysis: a survey of its theoretical and experimental development. *The Biochemical journal* 286 (Pt 2), 313-330.
69. Feng, R., Li, Y., Zhao, D., Wang, C., Niu, Y., and Sun, C. (2009). Lack of association between TNF 238 G/A polymorphism and type 2 diabetes: a meta-analysis. *Acta diabetologica* 46, 339-343.
70. Fernandez, E.B. (2006). [Monogenic forms of diabetes mellitus]. *Anales de la Real Academia Nacional de Medicina* 123, 211-217; discussion 218.
71. Ferrer, J. (2002). A genetic switch in pancreatic beta-cells: implications for differentiation and haploinsufficiency. *Diabetes* 51, 2355-2362.

72. Ferrer-Costa C, Gelpí JL, Zamakola L, Parraga I, de la Cruz X, Orozco M. (2005). PMUT: a web-based tool for the annotation of pathological mutations on proteins. *Bioinformatics* 21, 3176-3178.
73. Ferroni, P., Basili, S., Falco, A., and Davi, G. (2004). Platelet activation in type 2 diabetes mellitus. *J Thromb Haemost* 2, 1282-1291.
74. Field, S.F., Howson, J.M., Smyth, D.J., Walker, N.M., Dunger, D.B., and Todd, J.A. (2007). Analysis of the type 2 diabetes gene, TCF7L2, in 13,795 type 1 diabetes cases and control subjects. *Diabetologia* 50, 212-213.
75. Florez, J.C., Hirschhorn, J., and Altshuler, D. (2003). The inherited basis of diabetes mellitus: implications for the genetic analysis of complex traits. *Annual review of genomics and human genetics* 4, 257-291.
76. Frayling, T.M., Evans, J.C., Bulman, M.P., Pearson, E., Allen, L., Owen, K., Bingham, C., Hannemann, M., Shepherd, M., Ellard, S., *et al.* (2001). beta-cell genes and diabetes: molecular and clinical characterization of mutations in transcription factors. *Diabetes* 50 Suppl 1, S94-100.
77. Froguel, P., Vaxillaire, M., Sun, F., Velho, G., Zouali, H., Butel, M.O., Lesage, S., Vionnet, N., Clement, K., Fougerousse, F., *et al.* (1992). Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 356, 162-164.
78. Froguel, P., Zouali, H., Vionnet, N., Velho, G., Vaxillaire, M., Sun, F., Lesage, S., Stoffel, M., Takeda, J., Passa, P., *et al.* (1993). Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *The New England journal of medicine* 328, 697-702.
79. Gaster, M., Franch, J., Staehr, P., Beck-Nielsen, H., Smith, T., and Schroder, H.D. (2000). Induction of GLUT-1 protein in adult human skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279, E1191-1195.
80. Genevay, S., Di Giovine, F.S., Perneger, T.V., Silvestri, T., Stingelin, S., Duff, G., and Guerne, P.A. (2002). Association of interleukin-4 and interleukin-1B gene variants with Larsen score progression in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 47, 303-309.
81. Gidh-Jain, M., Takeda, J., Xu, L.Z., Lange, A.J., Vionnet, N., Stoffel, M., Froguel, P., Velho, G., Sun, F., Cohen, D., *et al.* (1993). Glucokinase mutations associated with non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus have decreased enzymatic activity: implications for structure/function relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 1932-1936.
82. Giuffrida, F.M., Furuzawa, G.K., Kasamatsu, T.S., Oliveira, M.M., Reis, A.F., and Dib, S.A. (2009). HNF1A gene polymorphisms and cardiovascular risk factors in individuals with late-onset autosomal dominant diabetes: a cross-sectional study. *Cardiovascular diabetology* 8, 28.
83. Gloyn, A.L. (2003). Glucokinase (GCK) mutations in hyper- and hypoglycemia: maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemia of infancy. *Human mutation* 22, 353-362.
84. Gloyn, A.L., Weedon, M.N., Owen, K.R., Turner, M.J., Knight, B.A., Hitman, G., Walker, M., Levy, J.C., Sampson, M., Halford, S., *et al.* (2003). Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 568-572.

85. Gogg, S., Smith, U., and Jansson, P.A. (2009). Increased MAPK Activation and Impaired Insulin Signaling in Subcutaneous Microvascular Endothelial Cells in Type 2 Diabetes-role of endothelin-1. *Diabetes*.
86. Grant, S.F., Thorleifsson, G., Reynisdottir, I., Benediktsson, R., Manolescu, A., Sainz, J., Helgason, A., Stefansson, H., Emilsson, V., Helgadóttir, A., *et al.* (2006). Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nature genetics* 38, 320-323.
87. Gresh, L., Fischer, E., Reimann, A., Tanguy, M., Garbay, S., Shao, X., Hiesberger, T., Fiette, L., Igarashi, P., Yaniv, M., *et al.* (2004). A transcriptional network in polycystic kidney disease. *The EMBO journal* 23, 1657-1668.
88. Groves, C.J., Zeggini, E., Minton, J., Frayling, T.M., Weedon, M.N., Rayner, N.W., Hitman, G.A., Walker, M., Wiltshire, S., Hattersley, A.T., *et al.* (2006). Association analysis of 6,736 U.K. subjects provides replication and confirms TCF7L2 as a type 2 diabetes susceptibility gene with a substantial effect on individual risk. *Diabetes* 55, 2640-2644.
89. Ha, E., Yang, S.H., Yoo, K.I., Chung, I.S., Lee, M.Y., Bae, J.H., Seo, J.C., Chung, J.H., and Shin, D.H. (2008). Interleukin 4 receptor is associated with an increase in body mass index in Koreans. *Life sciences* 82, 1040-1043.
90. Hajdúch, E., Hainault, I., Meunier, C., Jardel, C., Hainque, B., Guerre-Millo, M., and Lavau, M. (1995). Regulation of glucose transporters in cultured rat adipocytes: synergistic effect of insulin and dexamethasone on GLUT4 gene expression through promoter activation. *Endocrinology* 136, 4782-4789.
91. Hamid, Y.H., Vissing, H., Holst, B., Urhammer, S.A., Pyke, C., Hansen, S.K., Glumer, C., Borch-Johnsen, K., Jorgensen, T., Schwartz, T.W., *et al.* (2005). Studies of relationships between variation of the human G protein-coupled receptor 40 Gene and Type 2 diabetes and insulin release. *Diabet Med* 22, 74-80.
92. Hansen, L., Jensen, J.N., Urioste, S., Petersen, H.V., Pociot, F., Eiberg, H., Kristiansen, O.P., Hansen, T., Serup, P., Nerup, J., *et al.* (2000). NeuroD/BETA2 gene variability and diabetes: no associations to late-onset type 2 diabetes but an A45 allele may represent a susceptibility marker for type 1 diabetes among Danes. Danish Study Group of Diabetes in Childhood, and the Danish IDDM Epidemiology and Genetics Group. *Diabetes* 49, 876-878.
93. Harries, L.W., Ellard, S., Stride, A., Morgan, N.G., and Hattersley, A.T. (2006). Isomers of the TCF1 gene encoding hepatocyte nuclear factor-1 alpha show differential expression in the pancreas and define the relationship between mutation position and clinical phenotype in monogenic diabetes. *Human molecular genetics* 15, 2216-2224.
94. Harrison, T.R. (2002). *PRINCIPLES OF MEDICINE*, Vol II, 15^o edn (McGraw-Hill).
95. Hernandez, A., Ferrer, M.D., Garcia, M.C., Serrano, S., Sanchez, C., Ascaso, J.F., and Carmena, R. (1989). [Insulin and peptide C secretion after food ingestion and the interaction of insulin with its erythrocyte receptor in a family with MODY type diabetes mellitus]. *Medicina clinica* 93, 281-285.
96. Hingorani, A.D., Liang, C.F., Fatibene, J., Lyon, A., Monteith, S., Parsons, A., Haydock, S., Hopper, R.V., Stephens, N.G., O'Shaughnessy, K.M., *et al.* (1999). A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation* 100, 1515-1520.

97. Hoch, M., Eberle, A.N., Peterli, R., Peters, T., Seboek, D., Keller, U., Muller, B., and Linscheid, P. (2008). LPS induces interleukin-6 and interleukin-8 but not tumor necrosis factor-alpha in human adipocytes. *Cytokine* 41, 29-37.
98. Hong, C., y Tontonoz, P. (2008). Coordination of inflammation and metabolism by PPAR and LXR nuclear receptors. *Current opinion in genetics & development* 18, 461-467.
99. Horikawa, Y., Iwasaki, N., Hara, M., Furuta, H., Hinokio, Y., Cockburn, B.N., Lindner, T., Yamagata, K., Ogata, M., Tomonaga, O., *et al.* (1997). Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nature genetics* 17, 384-385.
100. Horwitz, D.L., Rubenstein, A.H., Reynolds, C., Molnar, G.D., and Yanaihara, N. (1975). Prolonged suppression of insulin release by insulin-induced hypoglycemia: demonstration by C-peptide assay. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* 7, 449-452.
101. Howell, W.M., Ali, S., Rose-Zerilli, M.J., and Ye, S. (2005). VEGF polymorphisms and severity of atherosclerosis. *Journal of medical genetics* 42, 485-490.
102. Howson, J.M., Walker, N.M., Smyth, D.J., and Todd, J.A. (2009). Analysis of 19 genes for association with type 1 diabetes in the Type 1 Diabetes Genetics Consortium families. *Genes and immunity* 10 Suppl 1, S74-84.
103. Hsieh, C.S., Zheng, Y., Liang, Y., Fontenot, J.D., and Rudensky, A.Y. (2006). An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nature immunology* 7, 401-410.
104. Huang, J., Karakucuk, V., Levitsky, L.L., and Rhoads, D.B. (2008). Expression of HNF4alpha variants in pancreatic islets and Ins-1 beta cells. *Diabetes/metabolism research and reviews* 24, 533-543.
105. Hull, J., Ackerman, H., Isles, K., Usen, S., Pinder, M., Thomson, A., and Kwiatkowski, D. (2001). Unusual haplotypic structure of IL8, a susceptibility locus for a common respiratory virus. *American journal of human genetics* 69, 413-419.
106. Huopio, H., Otonkoski, T., Vauhkonen, I., Reimann, F., Ashcroft, F.M., and Laakso, M. (2003). A new subtype of autosomal dominant diabetes attributable to a mutation in the gene for sulfonylurea receptor 1. *Lancet* 361, 301-307.
107. Huth C, Heid IM, Vollmert C, Gieger C, Grallert H, Wölford JK, Langer B, Thorand B, Klopp N, Hamid YH, Pedersen O, Hansen T, Lyssenko V, Groop L, Meisinger C, Döring A, Löwel H, Lieb W, Hengstenberg C, Rathmann W, Martin S, Stephens JW, Ireland H, Mather H, Miller GJ, Stringham HM, Boehnke M, Tuomilehto J, Boeing H, Möhlig M, Spranger J, Pfeiffer A, Wernstedt I, Niklason A, López-Bermejo A, Fernández-Real JM, Hanson RL, Gallart L, Vendrell J, Tsiavou A, Hatziaelaki E, Humphries SE, Wichmann HE, Herder C, Illig T. (2006). IL6 gene promoter polymorphisms and type 2 diabetes: joint analysis of individual participants' data from 21 studies. *Diabetes* 55, 2915-2921.
108. Ikegami, H., Kawabata, Y., Noso, S., Fujisawa, T., and Ogihara, T. (2007). Genetics of type 1 diabetes in Asian and Caucasian populations. *Diabetes research and clinical practice* 77 Suppl 1, S116-121.
109. Iwasaki, N., Oda, N., Ogata, M., Hara, M., Hinokio, Y., Oda, Y., Yamagata, K., Kanematsu, S., Ohgawara, H., Omori, Y., *et al.* (1997). Mutations in the hepatocyte nuclear factor-

- 1alpha/MODY3 gene in Japanese subjects with early- and late-onset NIDDM. *Diabetes* **46**, 1504-1508.
110. Iwata, I., Nagafuchi, S., Nakashima, H., Kondo, S., Koga, T., Yokogawa, Y., Akashi, T., Shibuya, T., Umeno, Y., Okeda, T., *et al.* (1999). Association of polymorphism in the NeuroD/BETA2 gene with type 1 diabetes in the Japanese. *Diabetes* **48**, 416-419.
 111. Iynedjian, P.B. (2009). Molecular physiology of mammalian glucokinase. *Cell Mol Life Sci* **66**, 27-42.
 112. Jacobson, E.M., Concepcion, E., Oashi, T., and Tomer, Y. (2005). A Graves' disease-associated Kozak sequence single-nucleotide polymorphism enhances the efficiency of CD40 gene translation: a case for translational pathophysiology. *Endocrinology* **146**, 2684-2691.
 113. Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T., and Edlund, H. (1994). Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* **371**, 606-609.
 114. Kaizer, E.C., Glaser, C.L., Chaussabel, D., Banchereau, J., Pascual, V., and White, P.C. (2007). Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from children with diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **92**, 3705-3711.
 115. Kalani, M. (2008). The importance of endothelin-1 for microvascular dysfunction in diabetes. *Vascular health and risk management* **4**, 1061-1068.
 116. Kamata, K., Mitsuya, M., Nishimura, T., Eiki, J., and Nagata, Y. (2004). Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. *Structure* **12**, 429-438.
 117. Kamimura, D., Ishihara, K., and Hirano, T. (2003). IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* **149**, 1-38.
 118. Karmann, K., Hughes, C.C., Schechner, J., Fanslow, W.C., and Pober, J.S. (1995). CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 4342-4346.
 119. Kawabe, T., Naka, T., Yoshida, K., Tanaka, T., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Kikutani, H. (1994). The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* **1**, 167-178.
 120. Keren H, Lev-Maor G, Ast G. (2010). Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nature Review Genetics* **11**, 345-355.
 121. Kim, K.Y., Cho, H.S., Jung, W.H., Kim, S.S., and Cheon, H.G. (2007). Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 suppression is an important process in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma signaling in adipocytes and myotubes. *Molecular pharmacology* **71**, 1554-1562.
 122. Kim, M.H., Minton, A.Z., and Agrawal, V. (2009). C/EBPbeta regulates metastatic gene expression and confers TNF-alpha resistance to prostate cancer cells. *The Prostate* **69**, 1435-1447.
 123. Klein, D., Timoneri, F., Ichii, H., Ricordi, C., and Pastori, R.L. (2008). CD40 activation in human pancreatic islets and ductal cells. *Diabetologia* **51**, 1853-1861.

124. Kotanides, H., y Reich, N.C. (1996). Interleukin-4-induced STAT6 recognizes and activates a target site in the promoter of the interleukin-4 receptor gene. *The Journal of biological chemistry* 271, 25555-25561.
125. Kristiansen, O.P. y Mandrup-Poulsen, T. (2005). Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? *Diabetes* 54 Suppl 2, S114-124.
126. Kristiansen, O.P., Nolsoe, R.L., Larsen, L., Gjesing, A.M., Johannesen, J., Larsen, Z.M., Lykkesfeldt, A.E., Karlsen, A.E., Pociot, F., and Mandrup-Poulsen, T. (2003). Association of a functional 17beta-estradiol sensitive IL6-174G/C promoter polymorphism with early-onset type 1 diabetes in females. *Human molecular genetics* 12, 1101-1110.
127. Kruse, S., Forster, J., Kuehr, J., and Deichmann, K.A. (1999). Characterization of the membrane-bound and a soluble form of human IL-4 receptor alpha produced by alternative splicing. *International immunology* 11, 1965-1970.
128. Kubota, M., Koshinaka, K., Kawata, Y., Koike, T., and Oshida, Y. (2008). Effects of continuous low-carbohydrate diet after long-term exercise on GLUT-4 protein content in rat skeletal muscle. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* 40, 24-28.
129. Lagathu, C., Yvan-Charvet, L., Bastard, J.P., Maachi, M., Quignard-Boulange, A., Capeau, J., and Caron, M. (2006). Long-term treatment with interleukin-1beta induces insulin resistance in murine and human adipocytes. *Diabetologia* 49, 2162-2173.
130. Lambrechts, D., Storkebaum, E., Morimoto, M., Del-Favero, J., Desmet, F., Marklund, S.L., Wyns, S., Thijs, V., Andersson, J., van Marion, I., *et al.* (2003). VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nature genetics* 34, 383-394.
131. Lammert, E., Gu, G., McLaughlin, M., Brown, D., Brekken, R., Murtaugh, L.C., Gerber, H.P., Ferrara, N., and Melton, D.A. (2003). Role of VEGF-A in vascularization of pancreatic islets. *Curr Biol* 13, 1070-1074.
132. Latek, R.R., Suri, A., Petzold, S.J., Nelson, C.A., Kanagawa, O., Unanue, E.R., and Fremont, D.H. (2000). Structural basis of peptide binding and presentation by the type I diabetes-associated MHC class II molecule of NOD mice. *Immunity* 12, 699-710.
133. Latini, G., Marcovecchio, M.L., Del Vecchio, A., Gallo, F., Bertino, E., and Chiarelli, F. (2009). Influence of environment on insulin sensitivity. *Environment international* 35, 987-993.
134. Lee, E.Y., Chung, C.H., Kim, J.H., Joung, H.J., and Hong, S.Y. (2006). Antioxidants ameliorate the expression of vascular endothelial growth factor mediated by protein kinase C in diabetic podocytes. *Nephrol Dial Transplant* 21, 1496-1503.
135. Lee, I.F., Qin, H., Trudeau, J., Dutz, J., and Tan, R. (2004a). Regulation of autoimmune diabetes by complete Freund's adjuvant is mediated by NK cells. *J Immunol* 172, 937-942.
136. Lee, M.S., Chang, I., and Kim, S. (2004b). Death effectors of beta-cell apoptosis in type 1 diabetes. *Molecular genetics and metabolism* 83, 82-92.
137. Lee, S.H., Ihm, C.G., Sohn, S.D., Lee, T.W., Kim, M.J., Koh, G., Oh, S.J., Woo, J.T., Kim, S.W., Kim, J.W., *et al.* (2004c). Polymorphisms in interleukin-1 beta and Interleukin-1 receptor antagonist genes are associated with kidney failure in Korean patients with type 2 diabetes mellitus. *American journal of nephrology* 24, 410-414.

138. Lee, Y.J., Huang, F.Y., Lo, F.S., Wang, W.C., Hsu, C.H., Kao, H.A., Yang, T.Y., and Chang, J.G. (2000). Association of CTLA4 gene A-G polymorphism with type 1 diabetes in Chinese children. *Clinical endocrinology* 52, 153-157.
139. Lehrke, M., y Lazar, M.A. (2005). The many faces of PPARgamma. *Cell* 123, 993-999.
140. Lehto, M., Bitzen, P.O., Isomaa, B., Wipemo, C., Wessman, Y., Forsblom, C., Tuomi, T., Taskinen, M.R., and Groop, L. (1999a). Mutation in the HNF-4alpha gene affects insulin secretion and triglyceride metabolism. *Diabetes* 48, 423-425.
141. Lehto, M., Wipemo, C., Ivarsson, S.A., Lindgren, C., Lipsanen-Nyman, M., Weng, J., Wibell, L., Widen, E., Tuomi, T., and Groop, L. (1999b). High frequency of mutations in MODY and mitochondrial genes in Scandinavian patients with familial early-onset diabetes. *Diabetologia* 42, 1131-1137.
142. Leibiger, B., Leibiger, I.B., Moede, T., Kemper, S., Kulkarni, R.N., Kahn, C.R., de Vargas, L.M., and Berggren, P.O. (2001). Selective insulin signaling through A and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic beta cells. *Molecular cell* 7, 559-570.
143. Lemos, M.C., Coutinho, E., Gomes, L., Bastos, M., Fagulha, A., Barros, L., Carrilho, F., Geraldés, E., Regateiro, F.J., and Carneiro, M. (2009). The CTLA4 +49 A/G polymorphism is not associated with susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Portuguese population. *International journal of immunogenetics* 36, 193-195.
144. Lernmark, A., Kloppel, G., Stenger, D., Vathanaprida, C., Falt, K., Landin-Olsson, M., Baskin, D.G., Palmer, J.P., Gown, A.M., Petersen, J.S., *et al.* (1995). Heterogeneity of islet pathology in two infants with recent onset diabetes mellitus. *Virchows Arch* 425, 631-640.
145. Li, H., Louey, J.W., Choy, K.W., Liu, D.T., Chan, W.M., Chan, Y.M., Fung, N.S., Fan, B.J., Baum, L., Chan, J.C., *et al.* (2008). EDN1 Lys198Asn is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Molecular vision* 14, 1698-1704.
146. Li, J., Ning, G., and Duncan, S.A. (2000). Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha. *Genes & development* 14, 464-474.
147. Li, J., Wu, F., Zhang, H., Fu, F., Ji, L., Dong, L., Li, Q., Liu, W., Zhang, Y., Lv, A., *et al.* (2009). Insulin inhibits leukocyte-endothelium adherence via an Akt-NO-dependent mechanism in myocardial ischemia/reperfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology* 47, 512-519.
148. Lima, A.F., Ropelle, E.R., Pauli, J.R., Cintra, D.E., Frederico, M.J., Pinho, R.A., Velloso, L.A., and De Souza, C.T. (2009). Acute exercise reduces insulin resistance-induced TRB3 expression and amelioration of the hepatic production of glucose in the liver of diabetic mice. *Journal of cellular physiology* 221, 92-97.
149. Linden, E., Cai, W., He, J.C., Xue, C., Li, Z., Winston, J., Vlassara, H., and Uribarri, J. (2008). Endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease results from advanced glycation end products (AGE)-mediated inhibition of endothelial nitric oxide synthase through RAGE activation. *Clin J Am Soc Nephrol* 3, 691-698.
150. Losekoot, M., Broekman, A.J., Breuning, M.H., de Koning, E.J., Romijn, J.A., and Maassen, J.A. (2005). [Molecular diagnosis on indication of maturity onset diabetes of the young; results from 184 patients]. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde* 149, 139-143.
151. Luotola, K., Paakkonen, R., Alanne, M., Lanki, T., Moilanen, L., Surakka, I., Pietila, A., Kahonen, M., Nieminen, M.S., Kesaniemi, Y.A., *et al.* (2009). Association of variation in the

- interleukin-1 gene family with diabetes and glucose homeostasis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94, 4575-4583.
152. Lyssenko, V., and Groop, L. (2009). Genome-wide association study for type 2 diabetes: clinical applications. *Current opinion in lipidology* 20, 87-91.
 153. Lyssenko, V., Lupi, R., Marchetti, P., Del Guerra, S., Orho-Melander, M., Almgren, P., Sjogren, M., Ling, C., Eriksson, K.F., Lethagen, A.L., *et al.* (2007). Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. *The Journal of clinical investigation* 117, 2155-2163.
 154. Ma, Z., Gong, Y., Patel, V., Karner, C.M., Fischer, E., Hiesberger, T., Carroll, T.J., Pontoglio, M., and Igarashi, P. (2007). Mutations of HNF-1beta inhibit epithelial morphogenesis through dysregulation of SOCS-3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 20386-20391.
 155. Mahalingam, B., Cuesta-Munoz, A., Davis, E.A., Matschinsky, F.M., Harrison, R.W., and Weber, I.T. (1999). Structural model of human glucokinase in complex with glucose and ATP: implications for the mutants that cause hypo- and hyperglycemia. *Diabetes* 48, 1698-1705.
 156. Maier, L.M., Chapman, J., Howson, J.M., Clayton, D.G., Pask, R., Strachan, D.P., McArdle, W.L., Twells, R.C., and Todd, J.A. (2005). No evidence of association or interaction between the IL4RA, IL4, and IL13 genes in type 1 diabetes. *American journal of human genetics* 76, 517-521.
 157. Malecki, M.T., Jhala, U.S., Antonellis, A., Fields, L., Doria, A., Orban, T., Saad, M., Warram, J.H., Montminy, M., and Krolewski, A.S. (1999). Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nature genetics* 23, 323-328.
 158. Malecki M. y Skupien J. (2008). Problems in differential diagnosis of diabetes types. *Polskie Archiwum Med Wewn* 118, 435-440.
 159. Mancini, F.P., Vaccaro, O., Sabatino, L., Tufano, A., Rivellese, A.A., Riccardi, G., and Colantuoni, V. (1999). Pro12Ala substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 is not associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 48, 1466-1468.
 160. Massa, L., Baltrusch, S., Okar, D.A., Lange, A.J., Lenzen, S., and Tiedge, M. (2004). Interaction of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2) with glucokinase activates glucose phosphorylation and glucose metabolism in insulin-producing cells. *Diabetes* 53, 1020-1029.
 161. McEvoy, R.C., and Hegre, O.D. (1977). Morphometric quantitation of the pancreatic insulin-, glucagon-, and somatostatin-positive cell populations in normal and alloxan-diabetic rats. *Diabetes* 26, 1140-1146.
 162. Mendel, D.B., y Crabtree, G.R. (1991). HNF-1, a member of a novel class of dimerizing homeodomain proteins. *The Journal of biological chemistry* 266, 677-680.
 163. Michel, T., y Vanhoutte, P.M. (2010). Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch*.
 164. Ministerio de Sanidad y Consumo. Estrategia en diabetes del Sistema Nacional de Salud (2007). http://www.msps.es/organizacion/sns/planCalidadSNS/pdf/excelencia/cuidadospalativos-diabetes/DIABETES/estrategia_diabetes_sistema_nacional_salud.pdf
 165. Mirel, D.B., Valdes, A.M., Lazzaroni, L.C., Reynolds, R.L., Erlich, H.A., and Noble, J.A. (2002). Association of IL4R haplotypes with type 1 diabetes. *Diabetes* 51, 3336-3341.

166. Mitsuyasu H, Yanagihara Y, Mao XQ, Gao PS, Arinobu Y, Ihara K, Takabayashi A, Hara T, Enomoto T, Sasaki S, Kawai M, Hamasaki N, Shirakawa T, Hopkin JM, Izuhara K. (1999). Cutting edge: dominant effect of Ile50Val variant of the human IL-4 receptor alpha-chain in IgE synthesis. *Journal of Immunology* 162, 1227-1231
167. Miura, A., Yamagata, K., Kakei, M., Hatakeyama, H., Takahashi, N., Fukui, K., Nammo, T., Yoneda, K., Inoue, Y., Sladek, F.M., *et al.* (2006). Hepatocyte nuclear factor-4alpha is essential for glucose-stimulated insulin secretion by pancreatic beta-cells. *The Journal of biological chemistry* 281, 5246-5257.
168. Moller, A.M., Dalgaard, L.T., Pociot, F., Nerup, J., Hansen, T., and Pedersen, O. (1998). Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in Caucasian families originally classified as having Type I diabetes. *Diabetologia* 41, 1528-1531.
169. Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science (New York, NY)* 275, 1787-1790.
170. Mosen, H., Ostenson, C.G., Lundquist, I., Alm, P., Henningsson, R., Jimenez-Feltstrom, J., Guenifi, A., Efendic, S., and Salehi, A. (2008). Impaired glucose-stimulated insulin secretion in the GK rat is associated with abnormalities in islet nitric oxide production. *Regulatory peptides* 151, 139-146.
171. Mysliwska, J., Zorena, K., Mysliwiec, M., Malinowska, E., Raczynska, K., and Balcerska, A. (2009). The -174GG interleukin-6 genotype is protective from retinopathy and nephropathy in juvenile onset type 1 diabetes mellitus. *Pediatric research* 66, 341-345.
172. Nakamura, S., Iwasaki, N., Funatsu, H., Kitano, S., and Iwamoto, Y. (2009). Impact of variants in the VEGF gene on progression of proliferative diabetic retinopathy. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 247, 21-26.
173. Nakashima, H., Miyake, K., Inoue, Y., Shimizu, S., Akahoshi, M., Tanaka, Y., Otsuka, T., and Harada, M. (2002). Association between IL-4 genotype and IL-4 production in the Japanese population. *Genes and immunity* 3, 107-109.
174. Nakken S, Alseth I, Rognes T. (2007). Computational prediction of the effects of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in human DNA repair genes. *Neuroscience* 145, 1273-1279
175. Nammo, T., Yamagata, K., Tanaka, T., Kodama, T., Sladek, F.M., Fukui, K., Katsube, F., Sato, Y., Miyagawa, J., and Shimomura, I. (2008). Expression of HNF-4alpha (MODY1), HNF-1beta (MODY5), and HNF-1alpha (MODY3) proteins in the developing mouse pancreas. *Gene Expr Patterns* 8, 96-106.
176. Naya, F.J., Huang, H.P., Qiu, Y., Mutoh, H., DeMayo, F.J., Leiter, A.B., and Tsai, M.J. (1997). Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes & development* 11, 2323-2334.
177. Naya, F.J., Stellrecht, C.M., and Tsai, M.J. (1995). Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes & development* 9, 1009-1019.
178. Newman, B., Selby, J.V., King, M.C., Slemenda, C., Fabsitz, R., and Friedman, G.D. (1987). Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins. *Diabetologia* 30, 763-768.

179. Ng, P.C., and Henikoff, S. (2001). Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome research* 11, 863-874.
180. Nicklin, M.J., Weith, A., and Duff, G.W. (1994). A physical map of the region encompassing the human interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-1 receptor antagonist genes. *Genomics* 19, 382-384.
181. Noble, J.A., Valdes, A.M., Lane, J.A., Green, A.E., and Erlich, H.A. (2006). Linkage disequilibrium with predisposing DR3 haplotypes accounts for apparent effects of tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha polymorphisms on type 1 diabetes susceptibility. *Human immunology* 67, 999-1004.
182. Nunez, C., Santiago, J.L., Varade, J., de la Calle, H., Figueredo, M.A., Fernandez-Gutierrez, B., de la Concha, E.G., Urcelay, E., and Martinez, A. (2008). IL4 in the 5q31 context: association studies of type 1 diabetes and rheumatoid arthritis in the Spanish population. *Immunogenetics* 60, 19-23.
183. Odegaard, J.I., y Chawla, A. (2008). Mechanisms of macrophage activation in obesity-induced insulin resistance. *Nature clinical practice* 4, 619-626.
184. Odegaard, J.I., Ricardo-Gonzalez, R.R., Red Eagle, A., Vats, D., Morel, C.R., Goforth, M.H., Subramanian, V., Mukundan, L., Ferrante, A.W., and Chawla, A. (2008). Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell metabolism* 7, 496-507.
185. Odom, D.T., Zizlsperger, N., Gordon, D.B., Bell, G.W., Rinaldi, N.J., Murray, H.L., Volkert, T.L., Schreiber, J., Rolfe, P.A., Gifford, D.K., *et al.* (2004). Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science (New York, NY)* 303, 1378-1381.
186. Orihara K, Morita H, Yagami A, Kajiwara N, Nakae S, Matsumoto K, Nagasaki H, Saito Y, Saito H, Matsuda A. (2009). TH2 cytokines potently induce an appetite-stimulating peptide, melanin-concentrating hormone, in human vascular endothelial cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 124, 612-614.
187. Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., and Sekiya, T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 2766-2770.
188. Ortis, F., Pirot, P., Naamane, N., Kreins, A.Y., Rasschaert, J., Moore, F., Theatre, E., Verhaeghe, C., Magnusson, N.E., Chariot, A., *et al.* (2008). Induction of nuclear factor-kappaB and its downstream genes by TNF-alpha and IL-1beta has a pro-apoptotic role in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 51, 1213-1225.
189. Ortmann, J., Nett, P.C., Celeiro, J., Traupe, T., Tornillo, L., Hofmann-Lehmann, R., Haas, E., Frank, B., Terraciano, L.M., and Barton, M. (2005). Endothelin inhibition delays onset of hyperglycemia and associated vascular injury in type I diabetes: evidence for endothelin release by pancreatic islet beta-cells. *Biochemical and biophysical research communications* 334, 689-695.
190. Oxombre, B., Moerman, E., Eeckhoutte, J., Formstecher, P., and Laine, B. (2002). Mutations in hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha) gene associated with diabetes result in greater loss of HNF4alpha function in pancreatic beta-cells than in nonpancreatic beta-cells and in reduced activation of the apolipoprotein CIII promoter in hepatic cells. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 80, 423-430.

191. Pare, G., Serre, D., Brisson, D., Anand, S.S., Montpetit, A., Tremblay, G., Engert, J.C., Hudson, T.J., and Gaudet, D. (2007). Genetic analysis of 103 candidate genes for coronary artery disease and associated phenotypes in a founder population reveals a new association between endothelin-1 and high-density lipoprotein cholesterol. *American journal of human genetics* *80*, 673-682.
192. Parra, E.J., Cameron, E., Simmonds, L., Valladares, A., McKeigue, P., Shriver, M., Wachter, N., Kumate, J., Kittles, R., and Cruz, M. (2007). Association of TCF7L2 polymorphisms with type 2 diabetes in Mexico City. *Clinical genetics* *71*, 359-366.
193. Patterson, C.C., Dahlquist, G.G., Gyurus, E., Green, A., and Soltesz, G. (2009). Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet* *373*, 2027-2033.
194. Pearson, E.R., Boj, S.F., Steele, A.M., Barrett, T., Stals, K., Shield, J.P., Ellard, S., Ferrer, J., and Hattersley, A.T. (2007). Macrosomia and hyperinsulinaemic hypoglycaemia in patients with heterozygous mutations in the HNF4A gene. *PLoS medicine* *4*, e118.
195. Petrescu, A.D., Hertz, R., Bar-Tana, J., Schroeder, F., and Kier, A.B. (2005). Role of regulatory F-domain in hepatocyte nuclear factor-4alpha ligand specificity. *The Journal of biological chemistry* *280*, 16714-16727.
196. Pickup, J.C. (2004). Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes care* *27*, 813-823.
197. Pineda, B., Laporta, P., Hermenegildo, C., Cano, A., and Garcia-Perez, M.A. (2008). A C > T polymorphism located at position -1 of the Kozak sequence of CD40 gene is associated with low bone mass in Spanish postmenopausal women. *Osteoporos Int* *19*, 1147-1152.
198. Poggi, M., Jager, J., Paulmyer-Lacroix, O., Peiretti, F., Gremeaux, T., Verdier, M., Grino, M., Stepanian, A., Msika, S., Burcelin, R., *et al.* (2009). The inflammatory receptor CD40 is expressed on human adipocytes: contribution to crosstalk between lymphocytes and adipocytes. *Diabetologia* *52*, 1152-1163.
199. Pontoglio, M. (2000). Hepatocyte nuclear factor 1, a transcription factor at the crossroads of glucose homeostasis. *J Am Soc Nephrol* *11 Suppl 16*, S140-143.
200. Pontoglio, M., Prie, D., Cheret, C., Doyen, A., Leroy, C., Froguel, P., Velho, G., Yaniv, M., and Friedlander, G. (2000). HNF1alpha controls renal glucose reabsorption in mouse and man. *EMBO reports* *1*, 359-365.
201. Pontoglio, M., Sreenan, S., Roe, M., Pugh, W., Ostrega, D., Doyen, A., Pick, A.J., Baldwin, A., Velho, G., Froguel, P., *et al.* (1998). Defective insulin secretion in hepatocyte nuclear factor 1alpha-deficient mice. *The Journal of clinical investigation* *101*, 2215-2222.
202. Postic, C., Shiota, M., Niswender, K.D., Jetton, T.L., Chen, Y., Moates, J.M., Shelton, K.D., Lindner, J., Cherrington, A.D., and Magnuson, M.A. (1999). Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *The Journal of biological chemistry* *274*, 305-315.
203. Prestwich, T.C., y Macdougald, O.A. (2007). Wnt/beta-catenin signaling in adipogenesis and metabolism. *Current opinion in cell biology* *19*, 612-617.
204. Price, J.A., Brewer, C.S., Howard, T.D., Fossey, S.C., Sale, M.M., Ji, L., Krolewski, A.S., and Bowden, D.W. (1999). A physical map of the 20q12-q13.1 region associated with type 2 diabetes. *Genomics* *62*, 208-215.

205. Prieur, X., Schaap, F.G., Coste, H., and Rodriguez, J.C. (2005). Hepatocyte nuclear factor-4alpha regulates the human apolipoprotein AV gene: identification of a novel response element and involvement in the control by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha, AMP-activated protein kinase, and mitogen-activated protein kinase pathway. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md 19, 3107-3125.
206. Prots, I., Skapenko, A., Wendler, J., Mattyasovszky, S., Yone, C.L., Spriewald, B., Burkhardt, H., Rau, R., Kalden, J.R., Lipsky, P.E., *et al.* (2006). Association of the IL4R single-nucleotide polymorphism I50V with rapidly erosive rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 54, 1491-1500.
207. Pruhova, S., Ek, J., Lebl, J., Sumnik, Z., Saudek, F., Andel, M., Pedersen, O., and Hansen, T. (2003). Genetic epidemiology of MODY in the Czech republic: new mutations in the MODY genes HNF-4alpha, GCK and HNF-1alpha. *Diabetologia* 46, 291-295.
208. Pugliese, A., Zeller, M., Fernandez, A., Jr., Zalcberg, L.J., Bartlett, R.J., Ricordi, C., Pietropaolo, M., Eisenbarth, G.S., Bennett, S.T., and Patel, D.D. (1997). The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDD2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nature genetics* 15, 293-297.
209. Qu, H.Q., Grant, S.F., Bradfield, J.P., Kim, C., Frackelton, E., Hakonarson, H., and Polychronakos, C. (2008). Association analysis of type 2 diabetes Loci in type 1 diabetes. *Diabetes* 57, 1983-1986.
210. Qu HQ, Tessier MC, Fréchette R, Bacot F, Polychronakos C. (2006). Lack of association of type 1 diabetes with the IL4R gene. *Diabetologia* 49, 958-961
211. Raab, S., y Plate, K.H. (2007). Different networks, common growth factors: shared growth factors and receptors of the vascular and the nervous system. *Acta neuropathologica* 113, 607-626.
212. Raj, S.M., Howson, J.M., Walker, N.M., Cooper, J.D., Smyth, D.J., Field, S.F., Stevens, H.E., and Todd, J.A. (2009). No association of multiple type 2 diabetes loci with type 1 diabetes. *Diabetologia* 52, 2109-2116.
213. Rau, H., Braun, J., Donner, H., Seissler, J., Siegmund, T., Usadel, K.H., and Badenhop, K. (2001). The codon 17 polymorphism of the CTLA4 gene in type 2 diabetes mellitus. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86, 653-655.
214. Redondo, M.J., and Eisenbarth, G.S. (2002). Genetic control of autoimmunity in Type I diabetes and associated disorders. *Diabetologia* 45, 605-622.
215. Rehman, K.K., Trucco, M., Wang, Z., Xiao, X., and Robbins, P.D. (2008). AAV8-mediated gene transfer of interleukin-4 to endogenous beta-cells prevents the onset of diabetes in NOD mice. *Mol Ther* 16, 1409-1416.
216. Resink, T.J., Scott-Burden, T., Boulanger, C., Weber, E., and Buhler, F.R. (1990). Internalization of endothelin by cultured human vascular smooth muscle cells: characterization and physiological significance. *Molecular pharmacology* 38, 244-252.
217. Rieusset, J., Bouzakri, K., Chevillotte, E., Ricard, N., Jacquet, D., Bastard, J.P., Laville, M., and Vidal, H. (2004). Suppressor of cytokine signaling 3 expression and insulin resistance in skeletal muscle of obese and type 2 diabetic patients. *Diabetes* 53, 2232-2241.

218. Ringel, J., Engeli, S., Distler, A., and Sharma, A.M. (1999). Pro12Ala missense mutation of the peroxisome proliferator activated receptor gamma and diabetes mellitus. *Biochemical and biophysical research communications* 254, 450-453.
219. Rosen, E.D., y Spiegelman, B.M. (2001). PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *The Journal of biological chemistry* 276, 37731-37734.
220. Roth, U., Curth, K., Unterman, T.G., and Kietzmann, T. (2004). The transcription factors HIF-1 and HNF-4 and the coactivator p300 are involved in insulin-regulated glucokinase gene expression via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *The Journal of biological chemistry* 279, 2623-2631.
221. Saxena, R., Voight, B.F., Lyssenko, V., Burt, N.P., de Bakker, P.I., Chen, H., Roix, J.J., Kathiresan, S., Hirschhorn, J.N., Daly, M.J., *et al.* (2007). Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science (New York, NY)* 316, 1331-1336.
222. Scott, L.J., Bonnycastle, L.L., Willer, C.J., Sprau, A.G., Jackson, A.U., Narisu, N., Duren, W.L., Chines, P.S., Stringham, H.M., Erdos, M.R., *et al.* (2006). Association of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) variants with type 2 diabetes in a Finnish sample. *Diabetes* 55, 2649-2653.
223. Schwitzgebel, V.M., Mamin, A., Brun, T., Ritz-Laser, B., Zaiko, M., Maret, A., Jornayvaz, F.R., Theintz, G.E., Michielin, O., Melloul, D., *et al.* (2003). Agenesis of human pancreas due to decreased half-life of insulin promoter factor 1. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88, 4398-4406.
224. Seo, B., Oemar, B.S., Siebenmann, R., von Segesser, L., and Luscher, T.F. (1994). Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. *Circulation* 89, 1203-1208.
225. Sethi, J.K., y Hotamisligil, G.S. (1999). The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. *Seminars in cell & developmental biology* 10, 19-29.
226. Sgouroudis, E., and Piccirillo, C.A. (2009). Control of type 1 diabetes by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: lessons from mouse models and implications for human disease. *Diabetes/metabolism research and reviews* 25, 208-218.
227. Shimabukuro, M., Ohneda, M., Lee, Y., and Unger, R.H. (1997). Role of nitric oxide in obesity-induced beta cell disease. *The Journal of clinical investigation* 100, 290-295.
228. Stamler, J., Vaccaro, O., Neaton, J.D., and Wentworth, D. (1993). Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes care* 16, 434-444.
229. Stoffel, M., Froguel, P., Takeda, J., Zouali, H., Vionnet, N., Nishi, S., Weber, I.T., Harrison, R.W., Pilgis, S.J., Lesage, S., *et al.* (1992a). Human glucokinase gene: isolation, characterization, and identification of two missense mutations linked to early-onset non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 7698-7702.
230. Stoffers, D.A., Stanojevic, V., and Habener, J.F. (1998). Insulin promoter factor-1 gene mutation linked to early-onset type 2 diabetes mellitus directs expression of a dominant negative isoprotein. *The Journal of clinical investigation* 102, 232-241.

231. Stoffers, D.A., Thomas, M.K., and Habener, J.F. (1997). Homeodomain Protein IDX-1 A Master Regulator of Pancreas Development and Insulin Gene Expression. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 8, 145-151.
232. Stone, L.M., Kahn, S.E., Deeb, S.S., Fujimoto, W.Y., and Porte, D., Jr. (1994). Glucokinase gene variations in Japanese-Americans with a family history of NIDDM. *Diabetes care* 17, 1480-1483.
233. Straczkowski M, Kowalska I, Nikolajuk A, Dzienis-Straczowska S, Szelachowska M, Kinalska I. (2003). Plasma interleukin 8 concentrations in obese subjects with impaired glucose tolerance. *Cardiovascular Diabetology* 16, 1-5
234. Strayer, L. (1995). *Biochemistry*, Vol I, 4th edn (New York, W.H. Freeman and Company).
235. Szabo, M., Peliskova, P., Kvapil, M., and Matous, M. (2009). Positive effect of long-term tailored physical activity therapy on diabetes mellitus management in an obese type 2 diabetic patient. *Neuro endocrinology letters* 30, 22-24.
236. Tamimi, R., Steingrimsson, E., Copeland, N.G., Dyer-Montgomery, K., Lee, J.E., Hernandez, R., Jenkins, N.A., and Tapscott, S.J. (1996). The NEUROD gene maps to human chromosome 2q32 and mouse chromosome 2. *Genomics* 34, 418-421.
237. Tan, J., Town, T., Mori, T., Obregon, D., Wu, Y., DelleDonne, A., Rojiani, A., Crawford, F., Flavell, R.A., and Mullan, M. (2002). CD40 is expressed and functional on neuronal cells. *The EMBO journal* 21, 643-652.
238. Tanizawa, Y., Matsutani, A., Chiu, K.C., and Permutt, M.A. (1992). Human glucokinase gene: isolation, structural characterization, and identification of a microsatellite repeat polymorphism. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 6, 1070-1081.
239. Tarumi, T., Kravtsov, D.V., Zhao, M., Williams, S.M., and Gailani, D. (2002). Cloning and characterization of the human factor XI gene promoter: transcription factor hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF-4alpha) is required for hepatocyte-specific expression of factor XI. *The Journal of biological chemistry* 277, 18510-18516.
240. Tashiro, K., Koyanagi, I., Saitoh, A., Shimizu, A., Shike, T., Ishiguro, C., Koizumi, M., Funabiki, K., Horikoshi, S., Shirato, I., *et al.* (2002). Urinary levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and interleukin-8 (IL-8), and renal injuries in patients with type 2 diabetic nephropathy. *Journal of clinical laboratory analysis* 16, 1-4.
241. Terauchi, Y., Sakura, H., Yasuda, K., Iwamoto, K., Takahashi, N., Ito, K., Kasai, H., Suzuki, H., Ueda, O., Kamada, N., *et al.* (1995). Pancreatic beta-cell-specific targeted disruption of glucokinase gene. Diabetes mellitus due to defective insulin secretion to glucose. *The Journal of biological chemistry* 270, 30253-30256.
242. Thomas, H., Jaschowitz, K., Bulman, M., Frayling, T.M., Mitchell, S.M., Roosen, S., Lingott-Frieg, A., Tack, C.J., Ellard, S., Ryffel, G.U., *et al.* (2001). A distant upstream promoter of the HNF-4alpha gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young. *Human molecular genetics* 10, 2089-2097.
243. Tiret, L., Poirier, O., Hallet, V., McDonagh, T.A., Morrison, C., McMurray, J.J., Dargie, H.J., Arveiler, D., Ruidavets, J.B., Luc, G., *et al.* (1999). The Lys198Asn polymorphism in the endothelin-1 gene is associated with blood pressure in overweight people. *Hypertension* 33, 1169-1174.

244. Tong, Y., Lin, Y., Zhang, Y., Yang, J., Zhang, Y., Liu, H., and Zhang, B. (2009). Association between TCF7L2 gene polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus: a large Human Genome Epidemiology (HuGE) review and meta-analysis. *BMC medical genetics* 10, 15.
245. Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Azuma, S., Yamamoto, T., and Inoue, J. (1999). Two differently regulated nuclear factor kappaB activation pathways triggered by the cytoplasmic tail of CD40. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 1234-1239.
246. Urhammer, S.A., Fridberg, M., Hansen, T., Rasmussen, S.K., Moller, A.M., Clausen, J.O., and Pedersen, O. (1997a). A prevalent amino acid polymorphism at codon 98 in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene is associated with reduced serum C-peptide and insulin responses to an oral glucose challenge. *Diabetes* 46, 912-916.
247. Urhammer, S.A., Rasmussen, S.K., Kaisaki, P.J., Oda, N., Yamagata, K., Moller, A.M., Fridberg, M., Hansen, L., Hansen, T., Bell, G.I., *et al.* (1997b). Genetic variation in the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene in Danish Caucasians with late-onset NIDDM. *Diabetologia* 40, 473-475.
248. Valenti L, Pulixi E, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Maggioni M, Orsatti A, Gianni C, Fargion S. (2005). TNFalpha genotype affects TNFalpha release, insulin sensitivity and the severity of liver disease in HCV chronic hepatitis. *Journal of Hepatology* 43, 944-950.
249. van der Werf, N., Kroese, F.G., Rozing, J., and Hillebrands, J.L. (2007). Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews* 23, 169-183.
250. Vaxillaire, M., Abderrahmani, A., Boutin, P., Bailleul, B., Froguel, P., Yaniv, M., and Pontoglio, M. (1999). Anatomy of a homeoprotein revealed by the analysis of human MODY3 mutations. *The Journal of biological chemistry* 274, 35639-35646.
251. Vaxillaire, M., Rouard, M., Yamagata, K., Oda, N., Kaisaki, P.J., Boriraj, V.V., Chevre, J.C., Boccio, V., Cox, R.D., Lathrop, G.M., *et al.* (1997). Identification of nine novel mutations in the hepatocyte nuclear factor 1 alpha gene associated with maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Human molecular genetics* 6, 583-586.
252. Vinik, A.I., Erbas, T., Park, T.S., Nolan, R., and Pittenger, G.L. (2001). Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes care* 24, 1476-1485.
253. Viollet, B., Lantier, L., Devin-Leclerc, J., Hebrard, S., Amouyal, C., Mounier, R., Foretz, M., and Andreelli, F. (2009). Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. *Front Biosci* 14, 3380-3400.
254. Vionnet, N., Stoffel, M., Takeda, J., Yasuda, K., Bell, G.I., Zouali, H., Lesage, S., Velho, G., Iris, F., Passa, P., *et al.* (1992). Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 356, 721-722.
255. Voronov, E., Shouval, D.S., Krelin, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., Dinarello, C.A., and Apte, R.N. (2003). IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 2645-2650.
256. Vosters, O., Beuneu, C., Nagy, N., Movahedi, B., Aksoy, E., Salmon, I., Pipeleers, D., Goldman, M., and Verhasselt, V. (2004). CD40 expression on human pancreatic duct cells: role in nuclear

- factor-kappa B activation and production of pro-inflammatory cytokines. *Diabetologia* 47, 660-668.
257. Vozarova, B., Fernandez-Real, J.M., Knowler, W.C., Gallart, L., Hanson, R.L., Gruber, J.D., Ricart, W., Vendrell, J., Richart, C., Tataranni, P.A., *et al.* (2003). The interleukin-6 (-174) G/C promoter polymorphism is associated with type-2 diabetes mellitus in Native Americans and Caucasians. *Human genetics* 112, 409-413.
 258. Wagenknecht, L.E., Zaccaro, D., Espeland, M.A., Karter, A.J., O'Leary, D.H., and Haffner, S.M. (2003). Diabetes and progression of carotid atherosclerosis: the insulin resistance atherosclerosis study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23, 1035-1041.
 259. Wagner, D.H., Jr., Vaitaitis, G., Sanderson, R., Poulin, M., Dobbs, C., and Haskins, K. (2002). Expression of CD40 identifies a unique pathogenic T cell population in type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 3782-3787.
 260. Wang, H., Maechler, P., Antinozzi, P.A., Hagenfeldt, K.A., and Wollheim, C.B. (2000). Hepatocyte nuclear factor 4alpha regulates the expression of pancreatic beta -cell genes implicated in glucose metabolism and nutrient-induced insulin secretion. *The Journal of biological chemistry* 275, 35953-35959.
 261. Wang, Y.I., McDuffie, M., and Lafferty, K.J. (1991). Antigen presentation and effector mechanisms in 'auto-immune' diabetes. *Journal of gastroenterology and hepatology* 6, 574-579.
 262. Watada, H. Role of VEGF-A in Pancreatic Beta Cells. (2010). *Endocrine journal*.
 263. Watada, H., Kajimoto, Y., Umayahara, Y., Matsuoka, T., Kaneto, H., Fujitani, Y., Kamada, T., Kawamori, R., and Yamasaki, Y. (1996). The human glucokinase gene beta-cell-type promoter: an essential role of insulin promoter factor 1/PDX-1 in its activation in HIT-T15 cells. *Diabetes* 45, 1478-1488.
 264. Weedon, M.N., Clark, V.J., Qian, Y., Ben-Shlomo, Y., Timpson, N., Ebrahim, S., Lawlor, D.A., Pembrey, M.E., Ring, S., Wilkin, T.J., *et al.* (2006). A common haplotype of the glucokinase gene alters fasting glucose and birth weight: association in six studies and population-genetics analyses. *American journal of human genetics* 79, 991-1001.
 265. Weir, G.C., Laybutt, D.R., Kaneto, H., Bonner-Weir, S., and Sharma, A. (2001). Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes* 50 Suppl 1, S154-159.
 266. Winckler, W., Burt, N.P., Holmkvist, J., Cervin, C., de Bakker, P.I., Sun, M., Almgren, P., Tuomi, T., Gaudet, D., Hudson, T.J., *et al.* (2005). Association of common variation in the HNF1alpha gene region with risk of type 2 diabetes. *Diabetes* 54, 2336-2342.
 267. Wirosko, B., Wong, T.Y., and Simo, R. (2008). Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. *Progress in retinal and eye research* 27, 608-621.
 268. Wood, I.S., and Trayhurn, P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *The British journal of nutrition* 89, 3-9.
 269. Xu, J.Y., Dan, Q.H., Chan, V., Wat, N.M., Tam, S., Tiu, S.C., Lee, K.F., Siu, S.C., Tsang, M.W., Fung, L.M., *et al.* (2005). Genetic and clinical characteristics of maturity-onset diabetes of the young in Chinese patients. *Eur J Hum Genet* 13, 422-427.

270. Yaacob NS, Kaderi MA, Norazmi MN. (2009). Differential transcriptional expression of PPARalpha, PPARgamma1, and PPARgamma2 in the peritoneal macrophages and T-cell subsets of non-obese diabetic mice. *Journal of Clinical Immunology* 29, 595-602.
271. Yamagata, K. (2003). Regulation of pancreatic beta-cell function by the HNF transcription network: lessons from maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Endocrine journal* 50, 491-499.
272. Yamagata, K., Furuta, H., Oda, N., Kaisaki, P.J., Menzel, S., Cox, N.J., Fajans, S.S., Signorini, S., Stoffel, M., and Bell, G.I. (1996a). Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* 384, 458-460.
273. Yamagata, K., Oda, N., Kaisaki, P.J., Menzel, S., Furuta, H., Vaxillaire, M., Southam, L., Cox, R.D., Lathrop, G.M., Boriraj, V.V., *et al.* (1996b). Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* 384, 455-458.
274. Yamagata, K., Yang, Q., Yamamoto, K., Iwahashi, H., Miyagawa, J., Okita, K., Yoshiuchi, I., Miyazaki, J., Noguchi, T., Nakajima, H., *et al.* (1998). Mutation P291fsinsC in the transcription factor hepatocyte nuclear factor-1alpha is dominant negative. *Diabetes* 47, 1231-1235.
275. Yan, J., Wang, C., Du, R., Liu, P., and Chen, G. Association analysis of CD40 gene polymorphism with acute coronary syndrome. *Clinical and experimental medicine*.
276. Zeggini, E., y McCarthy, M.I. (2007). Identifying susceptibility variants for type 2 diabetes. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ 376, 235-250.
277. Zhu, Q., Yamagata, K., Miura, A., Shihara, N., Horikawa, Y., Takeda, J., Miyagawa, J., and Matsuzawa, Y. (2003). T130I mutation in HNF-4alpha gene is a loss-of-function mutation in hepatocytes and is associated with late-onset Type 2 diabetes mellitus in Japanese subjects. *Diabetologia* 46, 567-573.
278. Ziemssen, F., Bellanne-Chantelot, C., Osterhoff, M., Schatz, H., and Pfeiffer, A.F. (2002). To: Lindner T, Cockburn BN, Bell GI (1999). Molecular genetics of MODY in Germany. *Diabetologia* 42: 121-123. *Diabetologia* 45, 286-287; author reply 287-288.

8. ANEXO

Nº LAB	SEXO	EDAD	TIPO DM	IL1B	CD40	IL4	IL8	IL6	CTLA4	TCF7L2	EDN1	PPARG	TNF ALFA	VEGF	NOS 298	IL4R I50V	HNF1A A98V
11459	HOMBRE	.	dm1	ct	CT	CT	AA	CG	AA	CC	GG	CC	GG	AC	GT	AA	CC
12375	HOMBRE	.	dm1	ct	CT	CC	AA	GG	AG	CT	GG	CC	GG	CC	GT	AG	CC
12378	HOMBRE	.	dm1	cc	CT	CT	AT	CG	AA	CC	TT	CG	GG	AC	GG	GG	CC
12397	HOMBRE	.	dm1	ct	CC	CT	AA	GG	AG	CT	GT	CC	AG	CC	GT	AA	CC
12402	HOMBRE	.	dm1	ct	CT	CT	AT	GG	AA	CT	GG	CC	GG	CC	GG	AA	CC
12562	HOMBRE	.	dm1	ct	CC	CC	AA	GG	AG	CC	GG	CC	GG	CC	GG	AG	CC
12563	HOMBRE	.	dm1	ct	CT	CC	AT	GG	AA	CC	GG	CG	GG	CC	GT	AG	CC
12567	HOMBRE	.	dm1	ct	CC	CC	AT	CC	AG	CC	GT	CG	GG	AC	GT	AA	CC
12568	MUJER	.	dm1	cc	CC	CT	TT	GG	AG	CC	GG	CC	GG	AA	GT	AG	CC
12570	MUJER	.	dm1	cc	TT	CC	AT	CC	AA	CT	GG	CG	GG	AC	GT	AG	CT
12571	HOMBRE	.	dm1	cc	CC	CC	AT	GG	AG	CC	GG	CC	AG	AC	GT	AA	CC
12572	HOMBRE	.	dm1	ct	CC	CC	TT	GG	AA	CT	GG	CC	GG	AC	GT	GG	CC
12574	HOMBRE	.	dm1	ct	CT	CC	AT	CG	GG	CC	GT	CC	AA	AA	GT	GG	CC
12661	HOMBRE	.	dm1	cc	CC	CC	AA	CG	AA	CC	GG	CC	GG	AC	GG	AG	CC
12779	MUJER	.	dm1	cc	TT	CC	AA	GG	AG	CT	GT	CC	AG	AA	GT	AG	CC
12856	MUJER	.	dm1	ct	CC	CC	AT	GG	AA	CC	GT	CC	GG	AC	GG	AG	CC
12876	MUJER	.	dm1	ct	CC	CC	AT	GG	AG	CC	GG	CC	GG	AC	GG	GG	CC
12916	MUJER	.	dm1	cc	CC	CC	AT	CG	AA	TT	GG	CC	GG	CC	GG	GG	CC
12964	HOMBRE	.	dm1	cc	CC	CC	AA	GG	AA	CT	GT	CC	AG	AA	GG	AG	CC
13003	MUJER	.	dm1	ct	TT	CC	AT	CG	AA	CT	GG	CC	GG	CC	GG	AG	CC
13022	MUJER	.	dm1	ct	CC	CT	AA	CG	AG	CT	GT	CC	GG	AC	GT	AA	CC
13032	HOMBRE	.	dm1	ct	CC	CT	TT	GG	GG	CT	GT	CC	GG	AC	GG	AG	CC
13037	MUJER	.	dm1	tt	TT	CC	AT	GG	AA	CC	GG	CG	GG	AC	TT	GG	CC
13156	HOMBRE	.	dm1	ct	CC	CT	TT	CG	AA	TT	GG	CC	GG	CC	GT	AG	CC
13181	HOMBRE	.	dm1	ct	CC	CT	AT	CG	AA	TT	GG	CC	GG	AC	GG	AG	CC
13195	HOMBRE	.	dm1	cc	CT	CC	AT	GG	AG	CC	GT	CC	AG	AC	GG	AG	CC
13245	MUJER	.	dm1	ct	CC	CC	AT	GG	AA	CT	GG	CG	GG	AC	GT	AG	CC
13301	MUJER	.	dm1	ct	CC	CT	AT	CG	AG	CT	GG	CC	AG	AC	GT	GG	CC
13635	HOMBRE	.	dm1	ct	CC	CC	AT	CG	AA	CT	GG	CG	GG	CC	GG	AG	CC
13636	HOMBRE	.	dm1	ct	CC	CC	TT	CG	AG	CC	GT	CC	GG	AC	TT	AG	CC
13793	HOMBRE	.	dm1	ct	CT	CC	AA	GG	AG	TT	GG	CC	AG	AA	TT	AG	CC
13795	HOMBRE	.	dm1	ct	CC	CC	TT	CG	AA	CC	GG	CC	GG	CC	GT	AG	CC
18738	HOMBRE	16	dm1	cc	CC	CC	AT	CC	AA	CC	GG	CC	AG	AC	GT	AA	CC
18741	HOMBRE	36	dm1	cc	CC	CC	TT	GG	AG	CT	GG	CC	GG	CC	GG	AG	CC
18771	HOMBRE	.	dm1	cc	CC	CT	TT	CG	AG	CT	GG	CC	GG	AC	GG	AG	CC
18772	HOMBRE	.	dm1	ct	CT	CT	AT	GG	AG	CT	GG	CC	GG	AC	GG	GG	CC
18773	MUJER	.	dm1	ct	CC	CT	TT	CG	AA	CC	GG	CC	AG	AC	GG	AA	CC
18774	HOMBRE	.	dm1	cc	CT	CT	TT	GG	AG	CT	GG	CC	GG	AC	GT	AA	CC
18775	MUJER	.	dm1	cc	CC	CC	AT	GG	AG	CC	GT	CC	AG	AC	TT	GG	CC
18776	MUJER	.	dm1	ct	CC	CT	AT	CG	AG	CC	GT	CC	AA	CC	GT	GG	CC
18777	HOMBRE	.	dm1	ct	CT	CC	TT	GG	GG	CT	GT	CC	GG	AC	GG	GG	CC
18778	MUJER	.	dm1	cc	CC	CC	AA	GG	AG	CT	GG	CC	GG	AC	GT	AG	CC
18781	MUJER	.	dm1	cc	CC	CC	AT	CG	AA	CT	GT	CC	AG	AA	GT	AA	CT
18782	HOMBRE	.	dm1	cc	CC	CC	TT	GG	AA	TT	GT	CC	GG	AC	GG	AG	CC
18783	MUJER	.	dm1	ct	CC	CC	TT	GG	AG	CC	GG	CC	GG	AC	GG	AA	CC
18784	MUJER	.	dm1	ct	CT	CC	AT	GG	AA	CT	GG	CC	GG	AC	GT	AA	CC
18785	MUJER	30	dm1	cc	CC	CT	AA	CG	AA	CT	GT	CC	GG	AC	GG	AG	CC
18786	MUJER	.	dm1	cc	CT	CC	TT	CG	AA	CT	GG	CC	AG	CC	GG	AA	CC
18787	MUJER	28	dm1	ct	CT	CC	AT	GG	AA	CC	GT	CC	GG	CC	GT	GG	CC

Nº LAB	SEXO	EDAD	TIPO DM	IL1B	CD40	IL4	IL8	IL6	CTLA4	TCF7L2	EDN1	PPARG	TNFA	VEGF	NOS 293	IL4R I50V	HNF1AA98V
18799	MUJER	22	dm1	ct	CT	CC	TT	CG	AA	TT	GG	CC	GG	CC	GG	GG	CC
18800	MUJER	24	dm1	cc	CT	CC	AT	CG	GG	CT	GG	CC	AG	CC	GG	AG	CC
18809	HOMBRE	17	dm1	cc	CT	CC	TT	GG	AA	CT	GT	CC	GG	AC	GG	AG	CC
18810	MUJER	.	dm1	ct	CT	CC	AA	CG	AG	CC	TT	CC	GG	AC	GG	GG	CC
18811	MUJER	36	dm1	cc	CC	CT	TT	CG	AA	CT	GG	CC	GG	AA	GT	AA	CT
18814	HOMBRE	.	dm1	cc	CT	CC	AT	CC	AG	CT	GT	CC	GG	AC	TT	AG	CC
18815	HOMBRE	.	dm1	cc	CC	CC	AT	CG	GG	CC	GT	CC	GG	AC	GT	GG	CC
18816	HOMBRE	.	dm1	cc	TT	CC	TT	CG	AG	CC	GG	CC	GG	AC	GT	GG	CC
18817	HOMBRE	.	dm1	ct	CC	CT	AT	CG	AA	CC	GG	CC	GG	AC	GT	AG	CC
18822	HOMBRE	.	dm1	ct	CC	CC	AT	CG	AG	CC	GT	CC	AA	CC	GG	AA	CC
18823	HOMBRE	.	dm1	tt	CT	CC	AT	CC	AA	CT	GG	CC	GG	CC	GT	GG	CC
18824	HOMBRE	.	dm1	ct	CC	CT	AA	CG	AG	CT	GG	CC	GG	AC	GT	GG	CC
18825	MUJER	.	dm1	ct	CT	CC	AT	GG	AG	CC	GT	CC	GG	AC	GT	GG	CC
18826	MUJER	24	dm1	ct	CC	CC	AT	CG	AA	CC	GT	CC	GG	CC	GT	AA	CC
18837	HOMBRE	.	dm1	cc	CT	CT	AT	GG	AA	CT	GG	CG	GG	AC	GT	AG	CC
18838	HOMBRE	.	dm1	cc	CT	CC	AT	CG	AA	CT	GT	CC	AG	AC	GT	AA	CC
18839	HOMBRE	.	dm1	ct	CT	CC	AA	CG	AA	CC	GT	CC	GG	AA	GT	AG	CC
18840	MUJER	.	dm1	cc	CC	CC	AT	GG	AA	CC	GG	CC	GG	AA	GG	AG	CC
18841	MUJER	.	dm1	cc	CC	CT	AA	CG	AA	CT	GG	CG	GG	AC	GT	AG	CC
18842	HOMBRE	.	dm1	cc	CC	CC	AT	CC	AG	CT	GG	CC	GG	CC	TT	GG	CC
18843	HOMBRE	.	dm1	ct	CC	CT	TT	GG	AA	TT	GG	CC	GG	AC	GT	AA	CC
18854	MUJER	.	dm1	ct	CC	CC	AT	CG	AA	CC	GT	CC	GG	AC	GG	AG	CC
18864	MUJER	.	dm1	cc	CT	CC	AT	CG	AA	CT	GG	CC	GG	AA	GG	AA	CC
18865	MUJER	.	dm1	cc	CC	CC	TT	GG	AG	TT	GG	CC	AG	CC	GT	AA	CC
18866	HOMBRE	.	dm1	cc	CT	CT	AT	GG	AA	CT	GG	CG	GG	AC	GG	AA	CC
18867	HOMBRE	.	dm1	cc	CT	CC	AT	GG	GG	CC	GT	CG	GG	AA	GT	GG	CC
18868	HOMBRE	.	dm1	cc	CT	CC	AT	CC	AG	CT	GT	CC	GG	CC	TT	AG	CC
18869	MUJER	.	dm1	cc	CC	CC	TT	CG	AG	CC	GT	CG	AG	AC	GT	AA	CC
18870	MUJER	.	dm1	ct	CC	CC	AT	CG	AG	CC	GG	CG	GG	AC	GT	AG	CC
18871	HOMBRE	.	dm1	tt	TT	CC	AT	GG	AG	CC	GG	CG	AG	AC	GG	AG	CC
18876	MUJER	.	dm1	cc	CC	TT	TT	GG	AG	TT	GG	CC	AG	AC	GT	AG	CC
18877	MUJER	.	dm1	ct	CT	CC	TT	CG	AG	TT	GG	CC	AG	AC	GG	AG	CC
18890	MUJER	22	dm1	ct	CT	CT	AT	GG	AG	CT	GG	CC	GG	AC	TT	AG	CC
18891	HOMBRE	.	dm1	cc	CT	CT	AT	CG	GG	CC	GG	CG	GG	AA	GT	AA	CT
18892	HOMBRE	25	dm1	tt	CC	CT	AT	GG	AA	CC	GG	CC	GG	AC	GT	GG	CC
18893	HOMBRE	49	dm1	cc	CT	CC	AT	GG	AA	CC	GT	CC	GG	AC	GT	AG	CC
18894	MUJER	.	dm1	ct	CT	CC	AT	GG	AA	CC	GG	CC	GG	AA	GT	AG	CC
18895	HOMBRE	.	dm1	ct	CT	TT	TT	CG	GG	TT	GT	CC	GG	CC	GG	AG	CC
18896	MUJER	.	dm1	cc	CT	CC	AT	CG	AG	TT	GG	CC	AG	CC	GT	AG	CC
18909	MUJER	.	dm1	cc	CT	CC	AT	CG	AA	CC	GG	CC	GG	AC	GT	AG	CC
18912	MUJER	.	dm1	ct	CC	CC	AA	GG	AA	CC	GG	CC	GG	CC	GT	GG	CC
18913	HOMBRE	.	dm1	cc	CT	CT	AT	CG	AG	CC	GG	CG	AA	AC	GT	AA	CC
18914	HOMBRE	.	dm1	tt	CC	CC	AA	GG	AA	CC	GT	CC	GG	CC	GG	GG	CC
18915	MUJER	27	dm1	tt	CC	CC	TT	CC	AG	CC	GG	CC	AG	AC	GT	GG	CC
18929	HOMBRE	.	dm1	tt	CC	CT	AT	CG	AA	CC	GG	CC	GG	AC	GG	AG	CC
18930	MUJER	71	dm1	ct	CT	CC	AT	CG	GG	CT	GT	CC	AG	AC	GG	AA	CC
18931	HOMBRE	.	dm1	ct	TT	CC	TT	CG	AG	CT	GT	CC	AG	AA	GT	AA	CC
18932	HOMBRE	.	dm1	cc	CC	CC	AT	GG	AA	CT	GG	CG	GG	AC	GG	AG	CC
18941	MUJER	31	dm1	cc	CC	CC	TT	CG	AA	CC	GG	CC	GG	AA	GG	AG	CC

Nº LAB	SEXO	EDAD	TIPO DM	IL1B	CD40	IL4	IL8	IL6	CTLA4	TCF7L2	EDN1	PPARG	TNFA	VEGF	NOS 293	IL4R 150V	HNF1AA98V
18942	MUJER	46	dm1	cc	CC	CC	AA	CG	AA	CC	GG	CC	GG	AA	GT	AG	CT
18963	MUJER	14	dm1	tt	CC	CT	AA	CG	GG	CC	GG	CC	GG	CC	GT	AA	CC
18964	MUJER	.	dm1	tt	CT	CC	AT	GG	GG	CC	GG	CC	GG	AC	GG	AG	CC
18977	HOMBRE	.	dm1	cc	TT	CT	AT	GG	AG	CT	TT	CC	GG	AC	GT	AG	CC
18978	MUJER	.	dm1	ct	CT	CC	AA	CG	GG	CT	GT	CC	GG	CC	GT	AA	CC
18979	MUJER	.	dm1	ct	CC	CC	AT	CG	AA	CT	GT	CC	GG	AC	GG	AG	CC
18985	MUJER	.	dm1	ct	CT	CT	AA	GG	AG	CT	GG	CC	GG	AC	GT	AG	CC
18986	HOMBRE	.	dm1	cc	CC	CT	AT	CG	AG	CT	GG	CC	AG	AA	GT	AG	CC
19017	HOMBRE	.	dm1	ct	CC	CT	TT	CG	AA	CT	GG	CC	AG	AA	GG	AA	CC
19030	MUJER	27	dm1	ct	CC	CT	AT	GG	AA	CT	GG	CC	GG	AC	GT	GG	CC
19062	MUJER	.	dm1	ct	CC	CC	AT	GG	AA	TT	GG	CC	GG	AC	GT	AG	CC
19063	MUJER	.	dm1	cc	TT	CT	TT	CG	GG	CC	GT	CC	GG	AC	GG	AA	CC
19085	MUJER	41	dm1	cc	CC	CC	TT	GG	GG	CT	GG	CC	AG	AC	GG	GG	CC
19086	MUJER	39	dm1	ct	CT	CC	TT	GG	GG	CT	GG	CC	GG	CC	GT	AG	CC
19105	MUJER	.	dm1	ct	CT	CT	AT	CC	AG	CC	GT	CC	AG	AC	GT	AG	CC
19106	HOMBRE	.	dm1	ct	CC	CC	AA	CG	AA	CT	GG	CC	GG	AA	GT	AG	CC
19107	HOMBRE	.	dm1	ct	TT	CC	AA	GG	AA	CC	GT	CC	GG	CC	GT	GG	CC
19108	HOMBRE	.	dm1	cc	CC	CC	AA	CG	AA	CT	GG	CC	AG	AC	GT	GG	CC
19109	HOMBRE	.	dm1	cc	CT	CT	AT	CC	AA	CC	GG	CC	GG	AC	GT	AA	CC
19110	MUJER	.	dm1	cc	CT	CC	AT	GG	AA	CC	GT	CG	GG	CC	GT	AG	CC
19126	MUJER	38	dm1	ct	CT	CC	AT	CC	AG	CC	GT	CC	GG	AC	GG	AG	CC
19136	HOMBRE	.	dm1	tt	CC	CC	AT	CG	AG	CT	GG	CC	AG	CC	GT	AG	CC
19137	MUJER	.	dm1	ct	CC	CT	AT	GG	AA	CC	GG	CC	GG	AA	GG	AA	CC
19138	HOMBRE	.	dm1	cc	CC	CC	TT	GG	AG	TT	GG	CC	AG	AC	GG	AG	CC
19139	HOMBRE	.	dm1	cc	CC	CC	AT	GG	AG	CT	GG	CC	GG	CC	GT	AG	CC
19140	HOMBRE	16	dm1	ct	CC	CT	AT	CG	GG	CT	GG	CC	GG	CC	GG	AA	CC
19149	MUJER	.	dm1	cc	CC	CT	AT	CG	AA	TT	TT	CC	AG	AC	GT	GG	CC
19150	MUJER	.	dm1	ct	CT	TT	AT	GG	AG	CT	GG	CC	GG	AC	GT	GG	CC
19151	HOMBRE	.	dm1	tt	CT	CC	AT	CG	AG	TT	GT	CC	GG	AC	GT	AG	CC
19152	HOMBRE	.	dm1	cc	CT	CC	AA	CG	AA	TT	GG	CC	GG	AC	GT	AG	CC
19153	MUJER	.	dm1	cc	CC	CC	TT	GG	AA	CT	GG	CG	GG	AC	GG	AA	CC
19154	MUJER	44	dm1	ct	CC	CC	TT	GG	AG	CT	GG	CG	GG	AA	GG	AG	CC
19155	HOMBRE	.	dm1	cc	CC	TT	AA	CG	AA	CC	GG	CC	AG	CC	GG	AG	CC
19156	HOMBRE	32	dm1	cc	CC	CT	AA	CG	AA	CT	GT	CC	GG	AC	GT	AG	CC
19164	MUJER	.	dm1	cc	CT	CC	AA	GG	AG	TT	GT	CC	GG	AC	GG	GG	CC
19165	MUJER	.	dm1	ct	CC	CC	AT	CG	AA	CC	GT	CG	GG	AC	GG	AA	CC
19166	HOMBRE	.	dm1	tt	CT	CC	AT	CG	AG	CT	GG	CC	GG	AC	TT	AG	CC
19178	HOMBRE	.	dm1	cc	CT	CT	AA	GG	AA	CC	GG	CC	GG	AC	GT	AG	CC
19179	MUJER	.	dm1	cc	TT	CC	AT	GG	AA	TT	GT	CC	GG	AC	GG	AG	CC
19192	HOMBRE	.	dm1	ct	CT	CC	TT	GG	AG	CT	GG	CC	AG	AC	TT	AA	CC
19193	HOMBRE	.	dm1	ct	CT	CT	TT	GG	AA	CC	GT	CG	GG	CC	GT	AG	CC
19203	HOMBRE	.	dm1	cc	CC	CC	AT	GG	AA	CC	GG	CG	AA	AA	GG	GG	CC
19204	HOMBRE	.	dm1	cc	CC	CC	AA	GG	AG	CC	GG	CC	GG	AC	TT	AA	CC
19205	MUJER	.	dm1	ct	CC	CC	AT	GG	AG	CC	GT	CC	AG	AA	GG	AG	CC
19211	HOMBRE	.	dm1	ct	CC	CC	TT	CG	AA	CT	GG	CC	AG	CC	TT	AA	CC
19212	MUJER	.	dm1	cc	CC	CC	AT	GG	AA	TT	GT	CC	GG	AA	GT	GG	CC
19221	HOMBRE	22	dm1	cc	CC	CT	AA	CC	AA	CT	GG	CC	GG	AA	GT	AG	CC
19222	HOMBRE	26	dm1	ct	CT	CC	TT	CG	AA	CT	GG	CC	AG	CC	TT	AG	CC
19223	MUJER	.	dm1	ct	CT	CC	TT	CG	AG	CT	GT	CC	GG	AA	GT	GG	CC
19224	HOMBRE	.	dm1	cc	CT	CC	AT	CG	AG	CC	GT	CC	GG	AA	GG	AG	CC
19225	MUJER	.	dm1	cc	TT	CC	AT	GG	GG	TT	GG	CC	GG	CC	GG	AG	CT
19226	HOMBRE	42	dm1	cc	CT	CC	AT	CG	AG	CC	GG	CC	GG	CC	TT	AG	CC
19245	HOMBRE	39	dm1	ct	CC	CC	AA	GG	AA	CT	GG	CC	AA	AA	GT	AA	CC

Nº LAB	SEXO	EDAD	TIPO DM	IL1B	CD40	IL4	IL8	IL6	CTLA4	TCF7L2	EDN1	PPARG	TNFA	VEGF	NOS 293	IL4R I50V	HNF1AA98V
19246	MUJER	.	dm1	cc	CC	CC	AT	CG	AG	CC	GG	CG	GG	CC	TT	GG	CC
19250	MUJER	.	dm1	tt	CT	CC	TT	GG	AA	CT	GG	CC	GG	CC	GT	AG	CC
19251	HOMBRE	.	dm1	ct	CT	CT	AT	GG	AG	CC	GG	CC	AG	CC	GT	AA	CC
19252	HOMBRE	27	dm1	ct	CT	CC	AT	GG	AG	CT	GG	CC	GG	CC	TT	AG	CC
19255	HOMBRE	.	dm1	ct	CC	CC	AT	GG	AA	CT	GG	CC	GG	AC	GG	AA	CC
19264	HOMBRE	27	dm1	ct	CT	CC	AT	CG	AG	CC	GG	CG	AG	AA	GT	GG	CC
19344	HOMBRE	29	dm1	ct	TT	CC	AA	GG	AG	CT	GG	CC	AG	CC	GG	AG	CC
19345	MUJER	25	dm1	cc	CC	CT	TT	GG	AA	CT	GG	CC	GG	AA	TT	AA	CC
19369	HOMBRE	31	dm1	cc	CT	CT	AT	GG	AG	CT	GT	CC	AG	CC	GG	AG	CC
19389	HOMBRE	41	dm1	cc	CC	CC	AT	CG	AA	CC	GT	CC	AA	CC	GG	AG	CC
19448	MUJER	53	dm1	cc	CT	CC	AT	CG	GG	TT	GG	CC	GG	AA	GT	AA	CC
19461	MUJER	31	dm1	ct	CC	CC	TT	GG	AA	CC	GT	CC	GG	AC	GG	AA	CC
19462	MUJER	56	dm1	ct	CC	CC	TT	GG	GG	CT	GT	CC	GG	AC	GT	AG	CC
19479	MUJER	.	dm1	cc	CT	CT	AA	GG	AG	CC	GG	CG	GG	AC	GG	AA	CC
19495	MUJER	20	dm1	cc	CC	CC	AT	GG	GG	CC	GG	CG	GG	AA	TT	AG	CC
19511	HOMBRE	65	dm1	ct	CT	CC	TT	GG	GG	CT	GT	CG	AG	AA	GT	AG	CC
19512	MUJER	63	dm1	cc	CT	CC	AT	CG	AG	CT	GG	CC	GG	CC	TT	AA	CC
19531	HOMBRE	34	dm1	cc	CC	CC	AT	CG	GG	TT	GG	CC	AA	AC	TT	AG	CC
19540	HOMBRE	25	dm1	cc	CC	CC	TT	GG	AG	CC	GG	CG	AG	AA	GT	AG	CT
19567	HOMBRE	37	dm1	ct	TT	CC	TT	CG	AG	CT	GG	CC	GG	AA	GG	AA	CC
19632	HOMBRE	24	dm1	ct	CT	CC	AT	CC	AA	CT	GG	CC	AG	CC	GT	AA	CC
5926	MUJER	68	dm2	ct	CT	CT	TT	CG	AA	CT	GT	CC	GG	AC	GT	AG	CC
7052	HOMBRE	74	dm2	cc	CC	CT	TT	GG	GG	CT	GG	CC	GG	AC	GG	AG	CC
7053	HOMBRE	32	dm2	ct	CT	CT	AT	CC	AA	CC	GT	CC	GG	AC	GT	AG	CC
7054	MUJER	59	dm2	cc	CC	CC	AT	GG	AG	CT	GG	CC	GG	AA	GT	GG	CC
7055	HOMBRE	65	dm2	cc	CC	CC	AT	CG	AA	CT	GG	CC	GG	AC	GT	GG	CC
7248	HOMBRE	74	dm2	ct	CC	CC	AT	CG	AA	TT	GG	CC	GG	CC	GT	AG	CC
7255	MUJER	59	dm2	cc	CC	CT	TT	GG	AG	TT	GG	CC	GG	AA	GT	AG	CC
7261	HOMBRE	51	dm2	cc	CC	CC	AA	CG	AG	CC	GG	CC	GG	AC	GT	AG	CC
7270	HOMBRE	41	dm2	cc	CT	CC	TT	CG	AA	CT	GG	CC	GG	AC	GT	GG	CC
7283	HOMBRE	75	dm2	ct	CT	CC	TT	CG	AA	CC	GG	CC	AG	AC	GG	AG	CC
7298	MUJER	56	dm2	tt	CT	CC	AT	CG	AA	CC	GT	CC	GG	AC	GT	AG	CC
7325	MUJER	84	dm2	ct	CT	CC	TT	GG	AA	CT	GG	CC	AG	AC	GG	AG	CC
7369	HOMBRE	62	dm2	cc	CT	CC	AT	CG	AG	CT	GT	CC	GG	AC	GT	AG	CC
7417	MUJER	34	dm2	ct	CT	CC	TT	GG	AA	CT	GT	CC	GG	AC	GT	AG	CC
7425	MUJER	78	dm2	ct	CC	CC	AT	GG	AG	CC	GG	CC	AG	CC	GT	AA	CC
7455	MUJER	51	dm2	cc	CT	CT	AT	GG	AA	CT	GG	CC	GG	AA	GG	AG	CC
7466	HOMBRE	69	dm2	ct	CC	CC	TT	GG	AA	CC	GT	CG	GG	AC	GT	GG	CC
7490	HOMBRE	59	dm2	cc	CC	CT	TT	CG	AA	CT	GT	CC	GG	AA	GG	AA	CC
7508	MUJER	75	dm2	ct	CC	CC	AA	GG	AG	CT	GT	CC	GG	AC	TT	AA	CC
7543	MUJER	67	dm2	cc	CT	CC	AA	CG	GG	CC	GG	CC	GG	CC	GT	AA	CC
7572	MUJER	51	dm2	ct	CT	CC	AT	GG	AA	CC	GG	CC	GG	AC	GG	AG	CC
7573	MUJER	69	dm2	ct	CC	CC	AT	CC	AG	CC	GT	CC	AG	AC	GT	AG	CC
7612	MUJER	36	dm2	tt	CC	CC	AT	CG	AA	CT	GT	CC	GG	CC	GG	AG	CC
7705	MUJER	81	dm2	cc	CT	CC	AT	CG	AG	TT	GT	CC	GG	CC	TT	AG	CC
7824	MUJER	70	dm2	ct	TT	CT	AT	CC	GG	CC	GG	CC	GG	AC	GG	GG	CC
7864	HOMBRE	83	dm2	cc	CT	CT	TT	CG	AA	CT	GG	CC	GG	AC	TT	AG	CC
7947	MUJER	50	dm2	cc	CC	CC	TT	GG	AG	TT	GG	CC	GG	AC	TT	AG	CC
7948	MUJER	44	dm2	cc	CC	CT	TT	CG	AA	TT	GG	CC	AG	CC	GG	AG	CC
7950	MUJER	40	dm2	cc	CC	CC	TT	GG	AA	CC	GT	CC	AG	AC	GG	GG	CC
7965	HOMBRE	29	dm2	ct	CC	CT	TT	GG	AG	CT	GG	CC	GG	AA	GG	GG	CC
7967	HOMBRE	43	dm2	ct	CC	CC	AA	GG	AA	CC	GT	CC	GG	AA	GT	AG	CC
7987	MUJER	73	dm2	ct	CT	CC	AT	GG	AA	CC	GT	CC	GG	AC	GG	AG	CC
8008	MUJER	55	dm2	tt	CT	CC	AT	CG	AA	TT	GT	CC	AG	AC	GG	AA	CC
8009	MUJER	68	dm2	ct	CC	CC	AT	CG	AG	CT	GG	CC	GG	AA	GG	GG	CC
8010	HOMBRE	47	dm2	ct	CT	CC	AT	CG	AA	CT	GG	CC	GG	AC	GG	GG	CC
8011	HOMBRE	43	dm2	ct	CC	CC	AA	GG	GG	CT	GG	GG	GG	CC	GG	AA	CC
8013	HOMBRE	64	dm2	ct	CT	CC	AA	CC	AG	CT	TT	CC	GG	AC	GT	AG	CC
8024	MUJER	77	dm2	cc	CT	CC	AA	CG	AG	CC	GG	CC	GG	AC	GG	AG	CC
8025	MUJER	70	dm2	ct	CC	CC	TT	CG	AG	CT	GG	CC	GG	AC	GG	AG	CC

Nº LAB	SEXO	EDAD	TIPO DM	IL1B	CD40	IL4	IL8	IL6	CTLA4	TCF7L2	EDN1	PPARG	TNFA	VEGF	NOS 293	IL4R I50V	HNF1AA98V
8026	HOMBRE	48	dm2	cc	TT	CC	TT	GG	AA	CT	GG	CG	GG	CC	GG	AG	CC
8027	HOMBRE	46	dm2	cc	CC	CC	AT	CC	AG	CT	GG	CC	GG	AA	GG	AA	CC
8037	MUJER	68	dm2	cc	CT	CC	AT	CG	GG	TT	GT	CG	GG	CC	GT	AG	CC
8038	HOMBRE	72	dm2	ct	CC	CT	AT	CG	AA	TT	TT	CC	GG	AA	GT	AG	CC
8039	MUJER	66	dm2	ct	CT	CC	AA	GG	AG	CC	GG	CC	GG	CC	GG	AA	CC
8040	MUJER	67	dm2	cc	CC	TT	AT	CG	AG	TT	GG	CC	GG	AA	GT	AG	CC
8041	MUJER	44	dm2	cc	CC	CC	AA	CG	AA	CC	GG	CC	GG	AC	GT	GG	CC
8042	MUJER	50	dm2	ct	CC	CC	AT	CG	AA	CC	GG	CC	GG	AC	TT	AA	CC
8043	HOMBRE	46	dm2	tt	CC	CT	AA	CG	GG	CC	GG	CG	GG	CC	TT	AA	CC
8068	MUJER	74	dm2	ct	CC	CC	AT	GG	AG	TT	GG	CC	GG	AA	GG	AA	CC
8069	HOMBRE	30	dm2	ct	CT	CC	AT	CG	AG	TT	GG	CC	AG	CC	GT	AA	CC
8077	MUJER	83	dm2	tt	CC	CC	AA	GG	AG	CT	GG	CC	GG	CC	GG	AG	CC
8113	HOMBRE	49	dm2	tt	CT	CT	AA	GG	AG	CC	GT	CC	GG	AC	GT	AG	CC
8126	HOMBRE	71	dm2	cc	CC	CT	AT	CG	AA	CT	TT	CC	GG	AC	TT	AG	CT
8127	MUJER	62	dm2	ct	CT	CC	TT	GG	AA	TT	GT	CC	GG	AC	GT	GG	CC
8128	HOMBRE	78	dm2	cc	CT	CC	TT	GG	AG	CT	GT	CC	AG	AC	GT	AA	CC
8129	MUJER	36	dm2	ct	CC	CT	AA	CG	AA	CC	GG	CC	GG	AA	GT	AA	CC
8130	MUJER	73	dm2	cc	CC	TT	TT	GG	AA	CC	GT	CC	AG	AC	GG	AA	CC
8131	HOMBRE	33	dm2	ct	CC	CT	AT	CG	AG	TT	GG	CC	GG	AC	GT	AG	CC
8132	HOMBRE	50	dm2	cc	CC	CC	AA	GG	AA	CT	GG	CC	GG	AA	GT	AG	CC
8147	MUJER	50	dm2	ct	CC	CT	AT	CG	AG	CC	GT	CC	GG	CC	GG	AG	CC
8148	HOMBRE	50	dm2	cc	CC	CT	TT	GG	AA	CC	GT	CC	GG	AC	GT	AG	CC
8150	MUJER	77	dm2	ct	CC	CC	AT	GG	AA	TT	GG	CC	AG	AC	GT	AG	CC
8169	MUJER	67	dm2	cc	CC	CC	AT	GG	AA	CT	GG	CC	GG	AC	GG	AA	CC
8204	HOMBRE	41	dm2	ct	CC	CT	AT	GG	AA	CC	GG	CC	AG	AA	GG	GG	CC
8207	MUJER	66	dm2	cc	CC	CC	AA	GG	AA	CC	GG	CG	AG	CC	GT	AA	CC
8222	HOMBRE	49	dm2	cc	CC	CC	AT	GG	AA	CC	GG	CC	GG	AA	TT	AA	CC
8223	MUJER	61	dm2	ct	CC	CC	AT	GG	AA	TT	GG	CC	AG	AC	GT	AG	CC
8237	MUJER	59	dm2	ct	CT	CT	AT	CG	AA	CT	GG	CC	GG	AC	GT	AG	CT
8258	MUJER	36	dm2	cc	TT	CT	AA	GG	AA	CC	GG	CG	GG	AC	GG	AA	CC
8269	MUJER	58	dm2	cc	CT	TT	AT	CC	AA	CC	GG	CC	AG	AC	GG	AG	CC
8329	MUJER	73	dm2	cc	CC	CC	AA	GG	AA	CC	GG	CG	GG	CC	GT	AG	CC
8346	HOMBRE	55	dm2	ct	CC	CC	TT	GG	AG	CC	GT	CC	AG	CC	GT	AG	CC
8348	MUJER	54	dm2	ct	CC	CC	AT	CG	AA	CT	GG	GG	AG	AA	GG	AG	CC
8349	MUJER	56	dm2	cc	CT	CC	TT	CC	AA	CT	GG	CC	GG	AC	GT	AG	CC
8350	MUJER	39	dm2	cc	CT	CT	AT	CC	AA	CC	GT	CC	AG	AC	GT	AG	CC
8370	HOMBRE	73	dm2	ct	CC	CT	AA	CC	AG	CC	GT	CG	AG	AC	GT	AG	CC
8371	MUJER	87	dm2	cc	CT	CT	TT	GG	AA	CC	GG	CC	GG	AC	GG	GG	CC
8372	MUJER	31	dm2	ct	CT	CC	TT	CG	AG	CT	GT	CC	GG	AC	GT	AA	CC
8378	MUJER	74	dm2	cc	CC	CC	AA	CG	AA	CC	GT	CG	AG	AA	GT	AA	CC
8437	MUJER	69	dm2	cc	CT	CC	AT	CG	AA	CT	GT	CC	GG	AC	GT	AG	CC
8593	HOMBRE	79	dm2	cc	CC	CT	TT	GG	AG	TT	GT	CC	AG	AC	TT	AA	CC
8887	MUJER	81	dm2	ct	CC	CC	AT	CG	AG	CC	GG	CC	GG	AA	GG	AG	CC
8889	MUJER	60	dm2	ct	CC	TT	AT	GG	AA	CT	GT	CC	GG	AC	GT	AG	CC
8890	MUJER	75	dm2	ct	CC	TT	AA	CG	AA	CC	GT	CC	AG	CC	GT	AG	CC
8891	HOMBRE	68	dm2	cc	CC	CT	TT	GG	GG	CT	GG	CC	GG	AC	TT	AG	CC
8938	MUJER	45	dm2	ct	CT	CT	AA	GG	AA	CT	GG	CC	GG	AC	GG	AG	CC
8939	HOMBRE	76	dm2	ct	CC	CT	TT	GG	AG	CT	GG	CC	GG	CC	GG	GG	CC
8965	MUJER	71	dm2	cc	CT	CC	AT	CG	AA	CC	GG	CC	GG	AC	TT	AG	CC
8966	HOMBRE	64	dm2	cc	CT	CT	AT	CG	AG	TT	GT	CC	AG	AC	GG	GG	CT
8969	HOMBRE	72	dm2	tt	CT	CT	AA	GG	AG	TT	GG	CC	GG	CC	GG	AA	CC
8970	MUJER	77	dm2	ct	TT	CT	AT	CC	AG	CT	GG	CC	GG	AC	GG	GG	CC
8971	MUJER	52	dm2	tt	CC	CT	AT	CG	AA	CC	GG	CC	GG	CC	GG	AG	CC
9025	MUJER	72	dm2	cc	CT	CC	TT	CG	AA	CC	TT	CC	GG	CC	GG	AG	CC
9026	HOMBRE	78	dm2	tt	CC	CT	AT	GG	AG	TT	GG	CC	GG	AA	GG	AG	CC
9027	MUJER	83	dm2	cc	CT	CC	AA	CG	AA	CT	GG	CC	AG	AC	TT	GG	CC
9032	HOMBRE	59	dm2	tt	CC	CC	TT	CG	AG	CC	GG	CC	GG	AC	GT	AG	CC
9033	MUJER	49	dm2	ct	CT	CC	AT	GG	AA	CT	GT	CG	GG	AC	GT	AG	CC
9035	MUJER	60	dm2	cc	CC	CC	AT	CG	AG	CC	GG	CC	GG	AA	GG	AG	CC

Nº LAB	SEXO	EDAD	TIPO DM	IL1B	CD40	IL4	IL8	IL6	CTLA4	TCF7L2	EDN1	PPARG	TNFA	VEGF	NOS 293	IL4R I50V	HNF1AA98V
9057	MUJER	70	dm2	ct	CT	CT	TT	CC	AA	TT	GG	CC	GG	AC	GG	AG	CC
9087	MUJER	79	dm2	ct	CC	CC	TT	CC	AG	CT	GG	CC	GG	CC	GG	AA	CC
9093	MUJER	71	dm2	ct	CT	TT	AT	OG	AG	TT	GG	CC	GG	AC	GG	AG	CC
9115	HOMBRE	67	dm2	cc	CT	CC	TT	GG	AA	CC	GT	CC	AG	CC	GG	AA	CC
9129	HOMBRE	64	dm2	tt	CC	CT	AT	CC	AG	CT	GG	CC	GG	AA	GG	AG	CC
9131	MUJER	90	dm2	cc	CT	CT	AT	OG	AG	CC	GG	CC	GG	AC	TT	AA	CC
9132	HOMBRE	56	dm2	ct	CT	CC	AT	CG	AG	CT	GT	CC	GG	AC	GG	GG	CC
9207	MUJER	62	dm2	ct	CC	CC	AA	CG	AG	CC	GT	CC	GG	AC	GT	AG	CC
9227	MUJER	76	dm2	cc	CT	CC	TT	GG	AG	CC	GT	CG	GG	AC	GG	AG	CC
9299	HOMBRE	60	dm2	ct	CC	CC	AT	CG	AA	CT	GG	CC	GG	CC	TT	GG	CC
9300	MUJER	60	dm2	cc	CC	CC	AT	GG	AA	TT	GT	CC	GG	AA	GT	GG	CC
9301	HOMBRE	79	dm2	ct	TT	CC	TT	GG	GG	CC	TT	CC	GG	AC	GT	GG	CC
9337	MUJER	54	dm2	ct	CT	TT	AT	GG	AG	CC	GG	CC	AG	AC	GT	GG	CC
9338	MUJER	76	dm2	cc	CC	CC	AT	GG	AA	CT	GG	CC	GG	CC	TT	AG	CC
9339	MUJER	82	dm2	ct	CC	CC	AA	GG	AA	CT	GT	CC	GG	AA	GT	GG	CT
9340	MUJER	56	dm2	ct	CC	CT	AA	GG	AG	TT	GT	CC	GG	AA	GT	GG	CC
9343	MUJER	68	dm2	cc	TT	CC	AA	CC	AG	CT	GG	CC	GG	AA	GG	AG	CC
9397	HOMBRE	73	dm2	tt	CC	CC	TT	GG	GG	CT	GG	CC	AG	AA	GT	AG	CC
9453	HOMBRE	60	dm2	ct	CC	CC	AT	.	AA	CT	GT	CC	GG	AA	GT	AG	CC
9459	MUJER	74	dm2	ct	CT	CC	TT	CC	GG	CT	GG	CG	AG	AA	GG	AA	CC
9494	HOMBRE	54	dm2	ct	CC	CC	AT	OG	AG	CC	TT	CC	GG	AC	GT	AA	CC
9510	HOMBRE	48	dm2	ct	CC	CT	AA	GG	AG	CT	GG	CC	GG	AC	GT	GG	CC
9528	HOMBRE	37	dm2	cc	CC	CT	TT	CG	AA	TT	GT	CC	GG	CC	GT	AG	CC
9543	HOMBRE	55	dm2	ct	CC	CC	TT	GG	AA	CC	GT	CC	GG	AC	GT	AG	CC
9544	HOMBRE	52	dm2	tt	CT	CC	TT	GG	AG	CC	TT	CC	GG	AA	GT	AG	CC
9579	HOMBRE	77	dm2	cc	CT	CC	AA	GG	AG	CT	GG	CC	GG	AC	TT	AG	CC
9599	MUJER	56	dm2	ct	CT	CC	AA	OG	AA	CT	GT	CC	GG	AC	TT	AA	CC
9622	MUJER	79	dm2	ct	TT	CC	AA	CG	AG	CC	GG	CC	GG	CC	GT	GG	CC
11975	MUJER	.	dm2	ct	CT	CC	AT	CG	AG	CC	GG	CC	GG	CC	GT	AG	CC
11979	MUJER	.	dm2	tt	CT	CT	AT	GG	AA	CC	GG	CC	GG	CC	GT	GG	CC
12036	HOMBRE	.	dm2	ct	CT	TT	AT	GG	AA	CT	GT	CC	AG	AC	GT	GG	CC
12373	MUJER	.	dm2	ct	CT	CC	TT	CG	AG	CC	GG	CC	GG	CC	GT	GG	CC
12398	MUJER	.	dm2	cc	TT	CC	TT	GG	AA	CT	GG	CC	GG	AA	GT	AG	CC
12399	HOMBRE	.	dm2	cc	CC	CC	TT	CC	AA	CC	GG	CC	AG	CC	GG	GG	CC
12401	MUJER	.	dm2	ct	CC	CC	AT	GG	AG	CT	GG	CC	GG	CC	GG	AG	CC
12561	MUJER	.	dm2	tt	CC	CT	AT	GG	AG	CC	GG	CC	GG	AC	GT	GG	CC
12605	HOMBRE	.	dm2	ct	CC	CC	AT	GG	AG	CT	GT	CG	GG	AC	GT	AG	CC
12606	HOMBRE	.	dm2	ct	CC	CC	AA	CC	AG	CC	GT	CC	GG	AA	GT	AG	CC
12634	MUJER	.	dm2	cc	TT	CT	AT	GG	AA	CT	GG	CC	GG	CC	GG	GG	CT
12759	HOMBRE	.	dm2	ct	CC	CC	AT	GG	AG	CT	GT	CG	GG	AA	TT	AG	CC
12761	HOMBRE	.	dm2	cc	CC	CT	AT	GG	AA	CC	GT	CC	GG	AA	GT	AG	CC
12858	HOMBRE	.	dm2	ct	CT	CC	AA	CC	AA	CT	GT	CC	GG	AC	GT	AG	CC
12882	HOMBRE	.	dm2	cc	CT	CC	AT	CG	GG	CT	GG	CC	GG	AC	GT	AG	CC
12940	HOMBRE	.	dm2	cc	CC	CC	AT	GG	AA	CT	GG	CC	AG	CC	GG	AG	CC
12889	HOMBRE	.	dm2	ct	CT	CT	AT	GG	AG	CT	GG	CC	GG	AC	.	AA	CC
12953	MUJER	.	dm2	ct	CT	CT	TT	GG	AG	CT	GG	CC	GG	AC	TT	GG	CC
12989	HOMBRE	.	dm2	ct	CT	CC	AT	CC	AA	CC	GT	CC	GG	AA	GG	AG	CC
13002	MUJER	.	dm2	ct	CC	CC	TT	CG	AA	CT	GT	CC	GG	AA	GT	AG	CC
13026	MUJER	.	dm2	ct	CT	CC	AT	GG	AG	CC	GT	CG	GG	CC	GG	AG	CC
13057	HOMBRE	.	dm2	tt	CC	CC	TT	CG	AA	CT	GG	CC	GG	AC	GG	AA	CC
13058	HOMBRE	.	dm2	tt	TT	CC	AT	CG	AG	CC	GG	CC	GG	AC	GT	AG	CC
13082	MUJER	.	dm2	ct	CT	CC	AT	GG	AG	CC	GT	CC	AG	AA	GG	AG	CT
13099	HOMBRE	.	dm2	ct	CT	CT	AA	CG	AG	CC	GG	CG	GG	AC	GT	AA	CT
13133	HOMBRE	.	dm2	ct	CC	CC	AT	CC	AG	TT	GG	CC	GG	AC	GG	GG	CT
13134	HOMBRE	.	dm2	tt	CT	CT	AA	GG	AG	CC	GT	CG	GG	AA	GG	AG	CC

Nº LAB	SEXO	EDAD	TIPO DM	IL1B	CD40	IL4	IL8	IL6	CTLA4	TCF7L2	EDN1	PPARG	TNFA	VEGF	NOS 293	IL4R I50V	HNF1AA98V
13135	HOMBRE	.	dm2	cc	CT	CC	AT	CC	AA	CT	GG	CC	AG	AA	GT	AA	CC
13150	MUJER	.	dm2	ct	CT	CC	AT	GG	AG	CT	GG	CG	GG	CC	GT	AA	CC
13152	MUJER	.	dm2	ct	CT	CC	AT	GG	AG	CC	GG	CC	GG	AA	GT	AA	CC
13261	MUJER	.	dm2	ct	CT	CC	AT	GG	AA	TT	GT	CG	AG	AC	TT	AG	CC
13634	MUJER	.	dm2	cc	CT	CT	AA	CG	AA	CC	GT	CC	GG	CC	GT	GG	CC
18715	HOMBRE	53	dm2	cc	TT	CC	AT	CG	AA	CT	GT	CC	GG	CC	TT	AG	CC
18716	MUJER	63	dm2	ct	CT	TT	AT	CG	AA	CC	GT	CC	GG	AC	GG	AG	CC
18907	MUJER	50	dm2	cc	CC	CC	AT	CG	AA	CT	GG	CC	GG	AC	GT	AA	CC
19206	MUJER	.	dm2	cc	CT	CT	AT	GG	AA	CT	GG	CC	GG	CC	TT	AG	CC
19286	MUJER	.	dm2	cc	TT	CC	AT	CG	GG	CC	GT	CC	GG	AC	TT	AG	CC
19287	MUJER	.	dm2	ct	CC	CC	AA	CG	AG	CC	GG	CC	GG	AC	GT	AG	CC
19310	HOMBRE	40	dm2	cc	CT	CC	AT	CG	AG	CT	GG	CC	AG	CC	GT	AG	CC
19311	MUJER	25	dm2	ct	CC	CC	AT	GG	GG	CC	GG	CG	GG	AC	GT	GG	CC
19449	MUJER	59	dm2	ct	CC	CC	AA	CG	GG	CT	GT	CC	AG	AC	TT	GG	CC
19450	MUJER	31	dm2	ct	CC	CC	TT	GG	AA	CT	GT	CC	GG	AA	GT	AG	CC
19885	HOMBRE	44	dm2	ct	CC	TT	AT	GG	AA	CC	GG	CC	GG	AC	GT	AG	CC
14162	MUJER	53	CONTROL	ct	TT	CC	AA	CC	AA	CC	GT	CC	GG	AA	GG	GG	CC
14163	MUJER	40	CONTROL	cc	CC	CC	AA	GG	AA	CT	TT	CC	GG	AC	GT	AA	CC
14165	HOMBRE	49	CONTROL	cc	CC	CC	TT	CC	AG	CT	GT	CC	GG	AA	GT	GG	CC
14167	MUJER	59	CONTROL	ct	CC	TT	TT	CG	AA	CT	GG	CC	GG	AA	GT	AG	CC
14170	HOMBRE	70	CONTROL	cc	CT	CT	AT	GG	AG	TT	GT	CC	GG	CC	TT	AG	CC
14176	MUJER	58	CONTROL	cc	CC	CT	AA	GG	GG	CT	GT	CC	GG	AC	GG	AG	CC
14177	MUJER	56	CONTROL	cc	CT	CT	AT	CC	AA	CC	GG	CC	GG	AC	GT	AG	CC
14178	MUJER	56	CONTROL	cc	CT	CC	TT	CG	GG	TT	GG	CC	GG	AC	GG	AG	CC
14179	MUJER	27	CONTROL	cc	TT	CT	AT	CG	AG	CC	GG	CG	GG	CC	GG	AG	CC
14182	MUJER	33	CONTROL	tt	CT	TT	AT	CG	GG	CC	GT	CC	GG	AA	GG	AG	CC
14183	MUJER	47	CONTROL	cc	CT	CC	AT	CG	AG	CT	GG	CC	GG	AA	GG	AA	CC
14186	HOMBRE	61	CONTROL	ct	CT	CT	TT	GG	AG	CC	GG	GG	GG	CC	GT	GG	CC
14188	MUJER	57	CONTROL	tt	TT	CC	TT	GG	AA	CC	GG	CC	AG	AC	GG	AA	CC
14189	MUJER	54	CONTROL	ct	CC	CC	AA	CC	AG	CC	GG	CG	GG	CC	GG	AA	CT
14192	MUJER	53	CONTROL	cc	CC	CC	AT	CG	AG	CT	GG	CC	GG	AC	GT	AG	CC
14194	MUJER	43	CONTROL	cc	CC	CC	TT	CG	GG	CC	GT	CC	GG	AC	GT	AA	CC
14195	HOMBRE	35	CONTROL	cc	CC	CC	AA	GG	AG	TT	GT	CG	GG	CC	GT	AG	CC
14197	MUJER	35	CONTROL	cc	CT	CC	AT	GG	AA	CT	GG	CC	AG	AA	GG	AA	CC
14214	MUJER	65	CONTROL	ct	CT	CC	AA	GG	GG	CC	TT	CC	AG	CC	GT	AA	CC
14216	MUJER	48	CONTROL	ct	CC	CT	TT	CG	AG	CC	GG	CC	GG	AA	GT	AA	CC
14217	MUJER	48	CONTROL	cc	CT	CT	AT	CG	AG	CC	GT	CC	GG	AA	GT	AG	CT
14218	MUJER	48	CONTROL	ct	CC	CC	AT	GG	AA	CT	GT	CC	GG	AC	GG	AG	CC
14219	MUJER	62	CONTROL	tt	CC	CT	AA	CG	AA	CC	GT	CG	GG	AA	TT	AA	CC
14220	HOMBRE	63	CONTROL	ct	CC	CC	AT	GG	AA	CC	GT	CC	GG	AC	GG	GG	CC
14221	MUJER	63	CONTROL	tt	CT	CC	TT	GG	AG	TT	GT	CG	GG	AA	GT	AA	CC
14222	MUJER	58	CONTROL	ct	TT	CC	AT	CG	AG	CT	GT	CC	GG	CC	GT	AG	CC
14223	HOMBRE	62	CONTROL	ct	CT	CC	AT	CC	GG	CT	GT	CG	GG	AA	GT	AG	CC
14226	HOMBRE	60	CONTROL	cc	TT	CT	AT	GG	AG	CC	GG	CC	GG	AC	GG	GG	CC
14227	HOMBRE	40	CONTROL	cc	CT	CC	TT	CG	AG	CC	GG	CC	GG	CC	GT	AA	CC
14228	MUJER	41	CONTROL	ct	CC	CT	TT	CC	AA	CT	GG	CC	GG	AA	GT	AG	CC
14229	MUJER	52	CONTROL	tt	CT	CC	AT	CG	AA	CC	GG	CC	GG	AA	GG	GG	CC
14230	HOMBRE	35	CONTROL	ct	CC	CC	AT	GG	AG	CC	GG	CC	GG	AC	GT	AA	CC
14232	MUJER	28	CONTROL	tt	CC	CT	AT	GG	AG	CC	GT	CG	AG	CC	GG	AG	CC
14233	MUJER	24	CONTROL	ct	CC	CC	TT	CG	AG	CC	GT	CG	GG	AC	GT	GG	CC
14234	MUJER	27	CONTROL	cc	CT	CC	AT	CG	AA	CT	GG	CC	GG	AC	GG	GG	CC
14235	MUJER	21	CONTROL	tt	CT	CC	AT	CG	AA	CC	GT	CC	GG	AC	GT	AA	CC
14236	MUJER	37	CONTROL	cc	CT	CC	TT	CG	AA	CC	GG	CG	GG	AC	TT	AG	CC
14237	HOMBRE	33	CONTROL	ct	CC	CC	TT	CG	AA	CT	TT	CC	GG	CC	GG	AG	CC
14238	MUJER	78	CONTROL	tt	TT	CC	AT	GG	AA	CT	GT	GG	GG	AA	GG	AA	CC
14239	MUJER	59	CONTROL	ct	CT	CT	AA	GG	AA	CC	GT	CC	GG	AA	GG	AA	CC
14241	MUJER	55	CONTROL	cc	CT	CC	AA	GG	GG	CC	TT	GG	GG	CC	GT	AA	CC
14242	MUJER	38	CONTROL	cc	CC	CC	AT	GG	AA	CT	GG	CC	GG	AC	GG	AA	CC
14243	MUJER	46	CONTROL	ct	CT	CC	AT	GG	AG	CC	GT	CC	GG	AC	GT	GG	CC
14244	MUJER	46	CONTROL	ct	CC	CC	AA	CG	AA	CT	GG	CC	GG	AC	GG	AG	CC

Nº LAB	SEXO	EDAD	TIPO DM	IL1B	CD40	IL4	IL8	IL6	CTLA4	TCF7L2	EDN1	PPARG	TNFA	VEGF	NOS 293	IL4R I50V	HNF1AA98V
14245	MUJER	43	CONTROL	cc	CC	CT	TT	GG	AG	CT	GT	CC	GG	AC	GG	AA	CC
14248	MUJER	45	CONTROL	ct	CC	CT	TT	GG	AA	CT	GG	CC	GG	AC	GG	AA	CC
14249	HOMBRE	57	CONTROL	ct	TT	CT	AT	CG	AA	CT	GG	CC	GG	CC	GT	AG	CC
14250	HOMBRE	50	CONTROL	tt	CT	CC	AA	CG	AG	TT	GG	GG	GG	CC	GG	AA	CC
14251	MUJER	41	CONTROL	cc	CC	CC	TT	CG	AG	CT	GG	CC	GG	AC	GT	AG	CC
14252	MUJER	49	CONTROL	cc	CC	CC	AA	GG	AA	CC	GG	CC	GG	AC	GG	AG	CC
14255	MUJER	58	CONTROL	cc	CT	CT	AT	CG	GG	TT	GG	CC	GG	AC	GT	AA	CC
14256	MUJER	57	CONTROL	cc	CT	CC	TT	CC	AA	CT	GG	CG	GG	CC	GG	AG	CC
14258	MUJER	61	CONTROL	ct	CT	CC	AA	GG	AG	CT	GG	CC	GG	AA	GT	AG	CC
14259	MUJER	51	CONTROL	tt	CC	CC	TT	GG	AG	CT	GG	CC	GG	CC	GT	AA	CC
14260	MUJER	62	CONTROL	cc	CT	CC	AA	CG	GG	CC	GG	CC	GG	AA	GT	AG	CC
14262	MUJER	62	CONTROL	ct	CC	TT	AT	GG	AG	CC	GT	CC	GG	AC	GG	AG	CC
14265	MUJER	53	CONTROL	ct	CT	CC	AT	GG	AA	CC	GG	CC	GG	AA	GT	AA	CC
14266	MUJER	47	CONTROL	tt	CT	CC	TT	GG	AG	CT	GT	CC	GG	CC	TT	AG	CC
14282	MUJER	50	CONTROL	cc	CC	CC	AA	CG	AG	CC	GG	CC	AG	CC	GT	AA	CC
14284	MUJER	34	CONTROL	cc	CC	CC	AA	GG	AA	CC	TT	CC	GG	AA	GT	AA	CC
14285	MUJER	62	CONTROL	cc	CT	CC	TT	CG	AA	CT	GG	CG	AG	AA	GG	AG	CC
14287	MUJER	44	CONTROL	ct	CT	CC	AT	CG	AG	CC	GT	CC	GG	AC	GT	AA	CT
14291	MUJER	41	CONTROL	cc	CT	CC	TT	CC	AA	CT	GG	CC	AG	CC	TT	AG	CC
14305	MUJER	46	CONTROL	cc	CT	CT	AA	CC	AA	CC	GT	CC	GG	CC	GG	AG	CC
14307	HOMBRE	36	CONTROL	ct	CC	CC	AT	GG	AG	CT	GT	CC	GG	AC	GG	.	CC
14311	MUJER	50	CONTROL	ct	CC	CC	AT	GG	GG	CT	GT	CC	GG	AC	GG	AG	CC
14312	MUJER	47	CONTROL	cc	CC	CT	AT	CG	AA	CC	GT	CC	GG	AC	TT	AA	CC
14316	HOMBRE	38	CONTROL	ct	CT	CT	AA	GG	AA	CT	GT	CC	GG	AA	GT	GG	CC
14317	MUJER	38	CONTROL	tt	CT	TT	AA	GG	AG	CC	GT	CC	GG	CC	GG	AA	CC
14327	MUJER	63	CONTROL	ct	CT	CC	TT	CG	AA	CC	GG	CC	GG	AC	GG	AA	CC
14328	HOMBRE	47	CONTROL	cc	CC	CC	TT	CG	AG	CC	GT	CC	GG	AA	GT	AA	CC
14336	MUJER	34	CONTROL	ct	CT	CC	AT	CG	AG	CT	GG	CC	GG	AC	GT	AA	CC
14337	MUJER	60	CONTROL	cc	CC	CC	AA	GG	AA	CC	GT	CC	GG	AC	GT	AA	CC
14338	HOMBRE	64	CONTROL	ct	CT	CC	TT	CG	AG	CC	GT	CC	GG	AA	TT	AA	CC
14341	HOMBRE	42	CONTROL	ct	CC	CC	AA	GG	AA	CC	GG	CC	GG	CC	GT	AG	CC
14342	HOMBRE	38	CONTROL	ct	TT	CT	TT	CC	AG	CT	GG	CC	GG	AC	TT	AA	CC
14354	MUJER	32	CONTROL	cc	CT	CT	AT	GG	AA	CC	GT	CC	GG	CC	GG	AG	CC
14361	MUJER	44	CONTROL	ct	CT	CC	AT	CG	AG	CC	GG	CC	GG	AC	GT	AA	CC
14362	MUJER	35	CONTROL	tt	CC	CC	AT	GG	AA	CC	GG	CC	GG	AC	GT	AG	CC
14363	MUJER	48	CONTROL	cc	CC	CC	TT	GG	AG	CC	GG	CC	AG	CC	GT	GG	CC
14366	MUJER	39	CONTROL	cc	CT	CC	AT	CG	AG	CT	GG	CC	GG	CC	GT	GG	CC
14379	MUJER	59	CONTROL	ct	CC	CC	AT	CG	AA	CT	GG	CC	AG	AC	GT	AA	CC
14380	MUJER	61	CONTROL	tt	CC	CC	TT	CG	AG	CC	GG	CC	GG	AA	GT	GG	CC
14381	MUJER	60	CONTROL	cc	CC	CC	AT	GG	AA	CT	TT	CC	GG	AC	GG	AG	CC
14384	HOMBRE	38	CONTROL	ct	CC	CT	AT	CC	AA	CC	GG	CC	GG	AC	GG	AG	CC
14387	MUJER	62	CONTROL	ct	CC	CC	AT	CG	GG	CT	GG	CC	GG	AC	GT	GG	CC
14388	MUJER	54	CONTROL	cc	CT	CT	AA	GG	AA	CT	GT	CC	GG	AC	GG	AA	CC
14394	HOMBRE	45	CONTROL	ct	CT	CC	AA	CG	GG	CT	GG	CC	GG	AA	GG	GG	CC
14416	MUJER	48	CONTROL	ct	CC	CC	TT	GG	AA	CT	GG	CC	GG	AC	GG	AA	CC
14432	MUJER	35	CONTROL	ct	CC	CC	AT	GG	AA	CC	GT	CC	GG	AC	GT	AG	
14433	MUJER	47	CONTROL	cc	CC	CC	AA	CC	AG	CC	GG	CC	GG	AC	GG	AG	CC
14434	MUJER	37	CONTROL	ct	CT	CC	AA	GG	AG	CC	GG	CC	GG	CC	GG	AA	CC
14438	MUJER	38	CONTROL	ct	TT	TT	AA	CG	AA	CT	GG	CG	AG	AC	GG	AG	CC
14439	MUJER	44	CONTROL	ct	CT	CC	AT	CG	AG	CT	GG	CG	GG	CC	GT	AG	CC

Nº LAB	SEXO	EDAD	TIPO DM	IL1B	CD40	IL4	IL8	IL6	CTLA4	TCF7L2	EDN1	PPARG	TNFA	VEGF	NOS 293	IL4R I50V	HNF1AA98V
14459	MUJER	47	CONTROL	cc	TT	CC	AT	CG	AG	CC	GG	CC	GG	AC	GT	AG	CC
14565	MUJER	50	CONTROL	cc	CT	CC	AT	CG	AA	CC	GG	CC	GG	AC	TT	AG	CT
14567	MUJER	50	CONTROL	tt	CT	CT	AT	GG	AA	CC	GG	CC	GG	AC	GT	AA	CC
14571	HOMBRE	36	CONTROL	cc	CT	CT	AT	CC	AA	TT	GG	CC	GG	AC	GG	AG	CC
14572	MUJER	38	CONTROL	ct	CT	TT	AA	GG	AA	TT	GG	CC	GG	AC	GT	AA	CC
14573	MUJER	40	CONTROL	ct	CT	CC	AA	GG	AA	CT	GG	CC	GG	AA	GG	AG	CC
14574	MUJER	48	CONTROL	ct	CC	CT	AT	CG	AG	TT	GG	CC	GG	CC	GT	AA	CC
14576	MUJER	41	CONTROL	cc	CC	CC	AT	GG	AG	CC	GG	CC	GG	CC	GG	GG	CC
14578	MUJER	59	CONTROL	tt	CT	CT	AT	CG	AA	CT	GG	CC	GG	AA	GT	GG	CC
14580	HOMBRE	33	CONTROL	ct	CT	CC	AT	CG	AA	CT	GG	CC	GG	AA	GT	GG	CC
14581	HOMBRE	55	CONTROL	ct	CC	CC	TT	GG	AA	CT	GG	CC	GG	AC	GT	AA	CC
14586	MUJER	39	CONTROL	cc	CC	CT	AT	CG	AA	CT	GT	CC	GG	AC	GG	AG	CC
14587	MUJER	51	CONTROL	ct	CT	CC	AA	CG	AA	CT	GG	CC	GG	AC	GG	GG	CC
14588	HOMBRE	25	CONTROL	cc	CT	CT	AT	CG	AA	CC	GG	CG	GG	CC	TT	GG	CC
14590	HOMBRE	56	CONTROL	ct	CT	CC	AT	GG	AA	CT	GT	CC	GG	AC	GG	AG	CC
14591	MUJER	55	CONTROL	cc	TT	CC	AT	CG	AG	CC	GG	CC	GG	AC	TT	GG	CC
14592	MUJER	39	CONTROL	tt	CC	CC	AT	GG	AG	TT	GG	CG	AG	AA	GT	AG	CC
14594	MUJER	25	CONTROL	ct	CC	CC	AT	CC	AG	CC	GT	CC	GG	AC	GT	AG	CC
14646	HOMBRE	35	CONTROL	cc	CT	CT	TT	CG	AG	CT	GG	CG	GG	AC	TT	GG	CT
14647	MUJER	44	CONTROL	cc	CT	CC	TT	GG	GG	CC	GT	CC	AG	AA	TT	AG	CC
14648	MUJER	35	CONTROL	tt	CT	CC	AT	GG	AA	CC	GT	CC	AG	CC	GT	GG	CC
14649	MUJER	30	CONTROL	cc	CC	CC	AT	GG	AA	TT	GT	CC	AG	AC	GT	AA	CC
14650	HOMBRE	35	CONTROL	ct	CC	CC	AA	CG	AA	CC	GT	CG	GG	AA	GT	GG	CC
14653	MUJER	64	CONTROL	ct	CC	CT	AA	CG	AA	CT	GG	CC	GG	AA	GT	AG	CC
14657	HOMBRE	21	CONTROL	ct	CT	CT	TT	CG	AA	CT	GG	CC	GG	CC	TT	AA	CT
14662	MUJER	33	CONTROL	ct	CC	CC	TT	GG	AA	CT	GG	CG	GG	AA	TT	AG	CT
14664	MUJER	19	CONTROL	cc	CC	CT	AT	GG	AA	CC	GT	CC	GG	AC	GT	AA	CC
14665	MUJER	52	CONTROL	ct	CT	CC	AA	CG	AA	CT	GT	CC	AG	AA	GT	AA	CC
14666	MUJER	52	CONTROL	ct	CT	CC	AT	CC	AG	CC	GG	CC	GG	AC	GG	AG	CC
14667	HOMBRE	29	CONTROL	tt	CC	CT	AT	GG	AG	CC	GG	CG	GG	AC	GT	AA	CC
14669	HOMBRE	38	CONTROL	cc	CC	CC	AT	GG	AG	CC	GG	CC	GG	CC	GT	GG	CC
14728	HOMBRE	29	CONTROL	ct	CC	CC	AT	GG	AA	CC	GT	CC	GG	AA	.	AG	CC
14731	MUJER	62	CONTROL	tt	CC	CT	AT	CG	AG	CC	GG	CG	GG	AA	GG	AA	CC
14732	HOMBRE	26	CONTROL	ct	TT	CC	AT	CG	AA	CC	GG	CC	GG	AC	GG	GG	CC
14733	HOMBRE	46	CONTROL	ct	CT	CC	AT	CC	AA	CT	GG	CC	GG	AA	GT	AG	CT
14734	MUJER	40	CONTROL	cc	CC	CT	TT	GG	AG	CT	GG	CC	AG	CC	TT	GG	CC
14735	MUJER	36	CONTROL	cc	CT	CC	TT	GG	AA	CC	GG	CC	GG	AA	GT	AA	CC
14738	MUJER	38	CONTROL	ct	CT	CC	AT	GG	AG	TT	GG	CC	AG	CC	GG	AA	CC
14739	HOMBRE	54	CONTROL	ct	TT	CT	TT	GG	AG	CT	GT	CC	GG	CC	TT	AA	CC
14741	MUJER	49	CONTROL	cc	CT	CC	AT	CC	AA	CC	GG	CC	GG	CC	GG	AG	CC
14745	MUJER	40	CONTROL	ct	CT	CC	AT	GG	AG	CC	GG	CC	GG	AC	GT	AG	CC
14756	MUJER	63	CONTROL	ct	CC	CC	AT	CC	AA	CT	GG	CC	GG	AA	GG	AA	CC
14757	HOMBRE	45	CONTROL	ct	CC	CC	TT	CG	AA	TT	GG	CC	GG	AA	GG	AA	CC
14590	HOMBRE	50	CONTROL	ct	TT	CC	AT	GG	AA	TT	TT	CC	GG	AC	GG	AG	CC
15008	MUJER	24	CONTROL	cc	TT	CC	TT	CG	GG	TT	GG	CC	GG	CC	GG	AG	CC
17273	HOMBRE	24	CONTROL	cc	CC	CC	AT	CG	AG	CT	GG	CG	GG	CC	GT	AG	CC
17274	HOMBRE	61	CONTROL	cc	CT	CT	TT	CG	AA	CC	GG	CC	GG	AC	GT	AA	CC
17275	HOMBRE	27	CONTROL	ct	CC	CT	AT	CG	GG	CC	GG	CC	GG	AC	GT	AA	CC
16791	MUJER	82	CONTROL	ct	TT	CC	AT	GG	AA	CC	GT	CC	GG	AA	GT	AG	CC
16939	HOMBRE	61	CONTROL	ct	CC	CC	AT	CC	AG	CT	GT	CC	GG	AC	GG	AG	CC
16940	MUJER	64	CONTROL	ct	CC	CC	AT	CG	AA	CT	GG	CC	GG	AA	GT	AG	CC
16941	MUJER	47	CONTROL	ct	CC	CC	TT	GG	AG	CT	GG	CC	GG	AC	GT	AA	CC
16942	HOMBRE	71	CONTROL	ct	CT	CT	TT	GG	AG	CC	GG	CC	GG	CC	GG	GG	CC
16961	HOMBRE	46	CONTROL	cc	CC	CT	TT	GG	AA	TT	GG	CC	GG	AC	TT	AA	CC
16963	MUJER	83	CONTROL	cc	CT	CC	TT	CG	AA	CC	GT	CC	GG	AC	GT	GG	CC
16964	MUJER	68	CONTROL	cc	CC	CC	AA	GG	AG	TT	GG	CC	GG	AC	GT	.	CC
16965	HOMBRE	85	CONTROL	cc	CT	CC	TT	CG	AA	CC	GT	CC	GG	AC	GT	GG	CC
16975	MUJER	54	CONTROL	tt	CC	CC	AT	CG	GG	CC	GG	CC	GG	AC	GG	AA	CC
16976	MUJER	55	CONTROL	ct	CT	CC	TT	GG	AA	CC	GG	CC	GG	AC	TT	AG	CC
16977	HOMBRE	60	CONTROL	ct	TT	CT	AT	GG	AA	CT	GG	CC	GG	AC	GT	GG	CC

Nº LAB	SEXO	EDAD	TIPO DM	IL1B	CD40	IL4	IL8	IL6	CTLA4	TCF7L2	EDN1	PPARG	TNFA	VEGF	NOS 293	IL4R I50V	HNF1AA98V
16978	HOMBRE	43	CONTROL	ct	CC	CC	AA	GG	AA	CC	GT	CC	GG	AC	GT	GG	CT
16981	MUJER	65	CONTROL	ct	CC	CC	TT	CG	AA	CC	TT	CG	GG	CC	GG	AG	CC
16983	HOMBRE	69	CONTROL	cc	CT	CC	TT	CG	GG	CT	GT	CC	GG	AC	GT	AG	CC
16989	HOMBRE	73	CONTROL	tt	CC	CC	AT	GG	AG	CC	GT	CC	GG	AC	GG	AG	CC
17007	HOMBRE	79	CONTROL	ct	CC	CT	AT	GG	AG	CT	GG	CG	GG	AC	GT	GG	CC
17008	HOMBRE	77	CONTROL	cc	TT	CT	AT	GG	AG	CC	GT	CC	GG	AA	GG	AA	CC
17009	HOMBRE	79	CONTROL	ct	CT	CC	AA	CG	AG	CT	GT	CC	AG	AC	GT	AG	CC
17010	MUJER	45	CONTROL	cc	CC	CC	AT	CG	AA	CT	GG	CC	GG	AA	GT	GG	CC
17011	MUJER	80	CONTROL	cc	CT	CT	AT	GG	GG	CT	GT	CC	GG	AC	GT	AA	CC
17012	HOMBRE	64	CONTROL	ct	CC	CC	AT	GG	GG	CT	GG	CC	GG	CC	GG	AG	CC
17013	HOMBRE	70	CONTROL	ct	TT	CC	TT	GG	AG	TT	GG	CC	GG	AA	GT	AG	CC
17043	MUJER	77	CONTROL	cc	CC	CC	AT	GG	AA	CC	GG	CC	GG	CC	GG	GG	CC
17052	HOMBRE	32	CONTROL	ct	CT	CC	AT	CC	AA	CC	GT	CC	GG	AA	TT	AG	CT
17053	MUJER	74	CONTROL	ct	CT	CC	TT	GG	AG	CC	GG	CC	GG	AC	GT	.	CC
17054	HOMBRE	80	CONTROL	ct	CT	CC	AT	GG	AG	CC	GG	CG	GG	AC	GG	AG	CC
17055	MUJER	42	CONTROL	ct	CC	CT	AT	CG	AG	CC	GT	CC	AG	AC	GT	AA	CC
17092	HOMBRE	42	CONTROL	ct	CC	CC	TT	CG	AA	CC	GT	CC	GG	CC	GG	AG	CC
17096	HOMBRE	60	CONTROL	ct	CT	CC	AT	CG	AA	CC	GG	CC	GG	AC	GT	AA	CC
17097	HOMBRE	78	CONTROL	ct	CC	CC	TT	CG	AG	CC	GG	CC	GG	AA	GT	AA	
17110	HOMBRE	51	CONTROL	cc	CC	CC	AT	CG	AG	CT	GT	CC	GG	AC	.	AG	CC
17135	MUJER	52	CONTROL	cc	CT	CC	TT	CG	AA	CT	GG	CC	AG	CC	GG	AA	CC
17201	MUJER	21	CONTROL	ct	TT	CC	AA	GG	AG	CC	GT	CC	AG	AC	GT	AG	CC
17204	MUJER	82	CONTROL	cc	CT	CC	TT	CC	GG	CT	GT	CC	GG	CC	GT	AA	CC
17205	MUJER	86	CONTROL	ct	CC	CT	AA	CG	AG	CC	GG	CC	GG	AA	GT	GG	CC
17206	MUJER	81	CONTROL	cc	CT	CC	AT	GG	GG	CC	GG	CC	GG	CC	GG	AG	CC
17207	MUJER	80	CONTROL	tt	CT	CC	AT	GG	AG	CT	GT	CC	GG	AC	GG	AG	CT
17231	MUJER	73	CONTROL	cc	CC	CT	TT	CG	AG	CT	GG	CG	GG	CC	GT	AG	CC
17232	MUJER	89	CONTROL	cc	CC	CT	AT	CG	AG	CC	GG	CC	GG	CC	GT	AG	CC
17251	MUJER	91	CONTROL	ct	CC	CC	AT	CG	AG	CC	GT	CC	GG	AA	GG	AG	CC
17253	MUJER	27	CONTROL	cc	CT	CC	AA	CG	AA	CT	GG	CC	GG	AC	GG	AA	CC
17254	HOMBRE	82	CONTROL	ct	CC	CT	TT	GG	AG	CT	GG	CC	AG	CC	GT	GG	CT
17255	MUJER	78	CONTROL	cc	CC	CC	AT	CG	AA	CC	GT	CC	GG	AA	GG	GG	CC
17256	HOMBRE	70	CONTROL	tt	CC	CC	AT	GG	AG	CT	GG	CC	GG	CC	GG	AG	CC
17257	MUJER	78	CONTROL	ct	TT	CC	AT	CC	AG	CT	TT	CC	GG	AA	GG	AA	CC
17258	MUJER	85	CONTROL	cc	CT	CT	AT	CG	AA	CT	GG	CC	GG	AC	.	AA	CC